

SÉRIE A, N° 3230

N° D'ORDRE : 4102

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre GUILLOT

1^{re} THÈSE. — Exposé critique des principales méthodes de mesures
des virus. Étude des virus de la fièvre aphteuse.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 8 AVR 1959 devant la Commission d'examen.

MM. THOMAS *Président.*

TRILLAT
TONNELLAT } *Examineurs.*

•••••

SÉRIE A, n° 3230

N° D'ORDRE : 4102

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre GUILLOT

1^{re} THÈSE. — Exposé critique des principales méthodes de mesures
des virus. Étude des virus de la fièvre aphteuse.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 AVR 1959 devant la Commission d'examen.

MM. THOMAS *Président.*

TRILLAT
TONNELLAT { *Examinateurs.*





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

Doyen J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	GALLIEN	T Embryologie.
FOCH	T Mécan. physique et expérimentale.	EICHHORN	T Biologie végétale (S.P.C.N.).
DE BROGLIE	T Théories physiques.	DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.).
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	Mlle CAUCHOIS	T Chimie physique.
PÉRÈS	T Mécan. des Fluides et applications.	THELLIER	T Physique du Globe.
M. CURIE	T Physique (S. P. C. N.).	L'HÉRITIER	T Génétique.
BARRABÉ	T Géol. struct. et Géol. appliquée.	GRIVET	T Radioélectricité.
J. BOURCART	T Géogr. physique et Géol. dynamique.	PONCIN	T Mécanique générale.
PLANTEFOL	T Botanique.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	QUELET	T Chimie organique.
PRÉVOST	T Chimie organique.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	CUVILLIER	T Géol. structurale et Géologie appliquée.
WYART	T Minéralogie.	JUNG	T Pétrographie.
TEISSIER	T Zoologie.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
MANGENOT	T Biol. végétale.	WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste.
MONNIER	T Physiol. générale.	VASSY	T Physique de l'Atmosphère.
PIVETEAU	T Paléontologie.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	M. PRUVOST	T Géologie.
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	AMIEL	T Chimie générale (P. C. B.).
LAFFITTE	T Chimie générale.	HOCART	T Minéralogie.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	J.-P. MATHIEU	T Physique (P. C. B.).
COULOMB	T Physique du Globe.	COUTEAUX	T Biol. animale (P. C. B.).
Mlle COUSIN	T Biol. animale (S. P. C. N.).	MAY	T Biol. animale (P. C. B.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	CHOQUET	T Calcul différentiel et intégral.
P. DRACH	T Zoologie.	FELDMANN	T Biologie (P. C. B.).
KASTLER	T Physique (E. N. S.).	GUINIER	T Physique des solides.
EPHRUSSI	T Génétique.	JOST	T Physiol. comparée.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	FORTET	T Calcul des probabilités.
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.).	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
GAUTHERET	T Biol. végétale (P. C. B.).	CHOUARD	T Physiol. végétale.
LUCAS	T Recherches physiques.	MALAVARD	T Aviation.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	BRELOT	T Calcul différentiel.
ARNULF	T Optique appliquée.	NORMANT	T Chimie organique.
M. MORAND	T Enseignement de Physique.	EÉNARD	T Chimie (P. C. B.).
SOLEILLET	T Physique.	BUVAT	T Botanique (E. N. S.).
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	DUGUÉ	T Statistiques mathém.
DANJON	T Astronomie.	GELOS	T Chimie (S. P. C. N.).
LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité.	SOULABAC	T Psychophysiologie.
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	ULRICH	T Physiologie végétale.
PETIT	T Biologie maritime.	MARÉCHAL	T Optique théorique et appliquée.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
		CHADEFAUD	T Botanique.
		DESTRIAU	T Physique (M. P. C.).
		Mlle LE BRETON	T Physiol. générale.
		SALEM	T Mathématiques générales.

LELONG	T	Mathématiques générales.	LAMOTTE	Zoologie (E. N. S.).
DEVILLERS		Anatomie et histologie comparée.	MICHEL André	T Chimie (S. P. C. N.).
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.	OLMER	T Energétique générale.
FRANCON	T	Physique (S. P. C. N.).	ROUAULT	T Physique générale.
GLANGEAUD	T	Géogr. physique et Géol. dynamique.	GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. P. C.).	BARCHEWITZ	Chimie physique.
PISOT	T	Calcul des Probabilités.	BROSSEL	Physique atomique.
ROCH E.	T	Géologie.	BUSER	Biologie animale (P. C. B.).
SCHATZMANN		Astrophysique.	CAMUS	Biologie végétale (P. C. B.).
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.	CASTAING	Physique générale.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.	CURIEN	Minéralogie et cristallographie.
LENNUIER		Physique (M. G. P.).	MOYSE	Physiologie végétale.
RIZET		Génétique.	NOIROT	Evolution des êtres organisés.
Mme TONNELAT	T	Théories physiques.	PANNETIER	Chimie (S. P. C. N.).
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).	POSSOMPES	Biologie animale (P. C. B.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.	PULLMANN	Chimie théorique.
AIGRAIN	T	Electrotechnique.	TEILLAC	Physique nucléaire et Radioactivité.
BRUSSET		Chimie minérale.	TONNELAT	Biologie physico-chimique.
M. LÉVY		Physique théorique.	VILLE	Econométrie.
LENORMANT	T	Physiologie.	WILLEMART	Chimie (P. C. B.).
Mme CHAIX		Chimie biologique.	DODÉ	T Chimie.
Mme HUREL-PY		Biol. végétale (P. C. B.).	FREYMANN	T Physique (S. P. C. N.).
PIAUX		Chimie (P. C. B.).	GUINOCHET	T Biologie végétale (Orsay).
LEDERER	T	Mécanique expérimentale des fluides.	ROLLET	T Chimie (P. C. B.).
BRUN		Chimie des substances organiques naturelles.	Mlle JOSIEN	T Chimie (P. C. B.).
Mme DUBREIL	T	Mathématiques.	CHEVALLEY	T Géométrie algéb. et théorie des groupes.
Mme LELONG	T	Mathématiques (E. N. S.).	ARNOULT	T Physique (Orsay).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).	CHAPELLE	T Physique (P. C. B.).
COTTE		Physique (M. P. C.).	DELANGE	T Mathématiques (Orsay).
DUBOIS J. E.	T	Chimie (S. P. C. N.).	DENY	T Méc. théorique des Fluides.
			LUCAS G.	T Géologie.

Secrétaire général C. MONIER.

A Monsieur le Docteur LEPINE

*qui nous a permis de travailler dans son
service à l'Institut Pasteur, et nous a
guidé dans nos essais.*

A Monsieur le Docteur GRABAR

*qui nous a aidé dans une bonne
partie de notre travail.*

A Monsieur le Docteur ATANASIU

*sans qui cette thèse n'aurait
pu être.*

A Messieurs les Professeurs
THOMAS, TRILLAT et TONNELAT

*qui ont bien voulu former notre
jury et s'intéresser à notre tra-
vail.*

INTRODUCTION

Le terme « virus » est employé depuis longtemps, mais son acception s'est modifiée au fur et à mesure de l'évolution de nos connaissances.

Il a d'abord signifié : agent ou substance hypothétique responsable de la transmission des maladies. En ce sens, l'expression « maladies virulentes » recouvrait l'ensemble des maladies infectieuses, même celles dont on connaissait l'agent responsable. Pasteur lui-même l'emploie dans ses premiers travaux sur la maladie du charbon ou du choléra, dont il isola les bactéries responsables. Cette signification, utilisée jusque très récemment dans la littérature, n'est plus employée actuellement, bien que demeurée assez courante dans le langage parlé.

Petit à petit, le terme de virus a désigné seulement les agents responsables des maladies dont on ne pouvait isoler de bactéries responsables visibles au microscope. Pasteur, n'ayant pu voir le germe rabique au cours de ses études sur la rage, a entrevu l'existence des virus en tant que germes différents des bactéries.

Il a fallu plusieurs expériences de filtration de l'agent de la mosaïque du tabac par Ivanowski (1892), de l'agent de la fièvre aphteuse par Löffler et Frosch (1897), puis de bien d'autres maladies animales et végétales pour qu'on distingue les « virus filtrants » ou « ultravirus » des autres germes connus; la distinction reposait essentiellement sur la propriété de traverser les filtres capables de retenir toutes les espèces microbiennes connues. La différence concernait donc la taille de ces ultravirus bien inférieure à celle des virus en général, et qui les rendait invisibles. Dans le premier numéro du *Bulletin de l'Institut Pasteur*, Emile Roux écrivait en 1903 :

« Il existe tout un monde d'êtres invisibles, et, depuis longtemps on est enclin à les rendre responsables de toutes les maladies dont le microbe n'est pas connu. Jusqu'en 1898, ces microbes invisibles n'étaient que des êtres de raison; les travaux de ces quatre dernières années leur ont donné une réalité. »

On a discuté de leur nature physique : les ultravirus étaient-ils des corpuscules élémentaires, comme les bactéries, ou des molécules chimiques en solution, comme les poisons? Cette question fut tranchée par les travaux de d'Hérelle sur les bactériophages et ceux de Borrel sur la vaccine; si le premier apportait des arguments théoriques, le second démontrait par l'utilisation de techniques spéciales qu'un ultravirus au moins pouvait être aperçu au microscope optique, et qu'il consistait de corpuscules élémentaires. Ces conclusions entraînèrent toute une série de recherches pour la mise en évidence d'autres corpuscules de virus, qui, dans la majorité des cas, restèrent invisibles. On en sait aujourd'hui la raison.

La nature corpusculaire des virus étant admise, il était normal d'essayer de connaître la forme et la taille des corpuscules. Leur invisibilité conduisit à mettre au point diverses méthodes indirectes, filtration, sédimentation, bombardement et diffraction des rayonnements; elles ont permis de jalonner le domaine de dimensions des virus, précisant même parfois leur structure interne. La découverte révolutionnaire de Stanley, en 1935, qui obtint des cristaux de virus de la mosaïque du tabac, provoqua l'application de la diffraction des rayons X à l'étude de la morphologie et de la structure des virus; c'est cette méthode qui a donné les résultats les plus complets, et certainement le virus le mieux connu est le virus de la mosaïque du tabac, principalement grâce à la diffraction des rayons X. On s'est ainsi aperçu que les corpuscules de virus avaient une régularité de forme et de taille telles qu'ils pouvaient former des assemblages compacts parfaitement réguliers dans les trois dimensions, réalisant de véritables mailles cristallines. La constance de la taille du virus de la mosaïque du tabac permet de s'en servir comme étalon pour les examens au microscope électronique d'autres virus.

A peu près vers la même époque, furent prises au microscope électronique les premières photographies de virus : virus de la mosaïque du tabac et de la fièvre aphteuse. Ces clichés, peu convaincants, étaient surtout la révélation d'une technique qui s'imposera comme la méthode principale d'étude de la structure des virus animaux, non encore cristallisés. Cette technique est irremplaçable pour l'étude du développement intracellulaire des virus. Elle a supplanté la plupart des autres méthodes indirectes, et l'étude des virus récemment reconnus responsables de certaines

maladies se fait d'abord pour ne pas dire exclusivement au microscope électronique.

En l'état actuel de nos connaissances, on définit les virus par leurs propriétés; et si la filtrabilité et l'invisibilité ne sont plus absolues, le caractère essentiel des virus est leur parasitisme obligatoire : leur multiplication ne se produit qu'à l'intérieur de cellules vivantes. Cela est un inconvénient pour leur étude, car les phénomènes sont compliqués par les inter-actions des virus et des cellules.

Notre travail tend d'abord à comparer ces principales méthodes de mesure des virus, directes ou indirectes; nous rechercherons et nous évaluerons, si possible, les principales causes d'erreurs, en commençant par le problème général et essentiel de la détermination de la virulence des suspensions. Nous verrons ainsi si tous les résultats de mensuration ont le même poids, quelles méthodes et quels nombres offrent les meilleures garanties.

Nous étudierons ensuite les virus de la fièvre aphteuse, plus spécialement grâce à la microscopie électronique; nous utiliserons la technique des cultures cellulaires, qui s'est généralisée pour ses nombreux avantages en virologie, supplantant les études *in vivo* dans certains cas; nous étudierons aussi les virus grâce aux méthodes de filtration et de centrifugation qui gardent toujours un intérêt pour les déterminations de la taille des virus.

PREMIERE PARTIE

Exposé critique des principales méthodes de mesure des virus

A. — TITRE D'UNE SUSPENSION VIRULENTE

MÉTHODES DE TITRAGE

Le premier problème de toute étude des virus est de savoir reconnaître si la suspension contient du virus, et en quelle quantité; il faut titrer la virulence de cette suspension pour pouvoir la comparer à celle d'autres suspensions. On s'adresse à l'une des caractéristiques du virus étudié, le plus souvent son pouvoir pathogène : la présence de virus est démontrée par l'apparition des lésions caractéristiques chez l'animal ou les animaux sensibles après inoculation, la quantité de virus est estimée d'après la courbe de titrage.

1. — *Courbe de titrage. Transformation en probit*

Lorsqu'on inocule aux animaux un volume constant de suspensions virulentes dont la concentration varie suivant une progression géométrique, le pourcentage des réponses positives (lésion ou mort des animaux) diminue avec la concentration ou son logarithme : la courbe $\text{pourcentage} = f$ (Logarithme de la concentration) est la courbe de titrage; elle est en forme de f , tout à fait analogue aux courbes de toxicité des substances médicamenteuses, souvent étudiées (210, 247, 32, 91). Elle traduit l'inégale résistance des animaux à des inoculations identiques d'un même produit : c'est la courbe intégrale de la courbe de distribution de cette résistance. On le vérifie grâce à la transformation d'ordon-

nées préconisée par Gaddum (91) : les pourcentages p sont remplacés par une nouvelle variable y telle que

$$p = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^y \frac{e^{-\frac{y^2}{2}}}{2} dy$$

à laquelle Bliss (32) ajoute + 5, définissant la nouvelle unité probit. Des tables numériques (87) donnent directement la valeur en probit correspondant à n'importe quel pourcentage. La nouvelle courbe de titrage $\text{probit} = f$ (Logarithme de la concentration) est une droite si la courbe de titrage en f est une courbe intégrale d'une courbe de distribution normale de la résistance des animaux; la pente de la droite est l'inverse de l'écart-type de la distribution des doses individuelles effectives.

Si cette courbe de titrage n'est pas une droite, l'explication la plus simple est que la résistance des animaux varie d'une façon anormale, certains animaux étant beaucoup plus sensibles au virus que les autres. Ce changement de variable permet donc de vérifier l'homogénéité de la sensibilité des animaux; et si la résistance des animaux n'est pas distribuée normalement, deux titrages successifs de la même suspension fourniront des courbes différentes ne pouvant être comparées.

A la suite des travaux de toxicologie de Trevan (247), on représente la courbe de titrage par la seule valeur de la concentration de la suspension pour laquelle la moitié des animaux inoculés sont malades ou morts : c'est la dose infectieuse ou dose léthale pour 50 % des animaux (D. I. 50 ou D. L. 50). Le titre

de la suspension s'exprime alors par le logarithme de $\frac{1}{\text{D. I. 50}}$.

Le titre se déduit par interpolation de la courbe de titrage : pour la courbe en f , on assimile la portion de courbe au voisinage de la D. I. 50 à une droite.

2. — Précision du titre

Fluctuations statistiques — Ecart type

Il existe deux sortes d'erreurs : l'erreur opératoire sur les dilutions et l'erreur statistique sur la résistance des animaux. La

première peut ne pas dépasser 2 à 4 % lorsqu'on réalise une dilution; la D. I. 50 est alors connue à 25 ou 30 % près, et l'erreur absolue sur le titre ne dépasse pas une unité de la première décimale. Pour la deuxième, seuls des titrages répétés pourraient l'évaluer; mais la transformation des pourcentages en probits permet de calculer l'écart type σ sans faire plusieurs titrages : Gaddum (91) a montré que la variance σ^2 du titre était égale à :

$$\sigma^2 = \frac{0,56 h s}{n}$$

n : nombre d'animaux inoculés pour chaque dilution.

h : logarithme de l'inverse de la raison de la progression géométrique des concentrations.

s : inverse de la pente de la droite de titrage = moitié de la différence entre le logarithme de la D. I. 84 et celui de la D. I. 16.

Pizzi (200) a donné une autre formule de la variance, peu différente puisqu'elle part de la formule de Gaddum, mais établie à l'aide d'approximations discutables et non vérifiées; aussi nous n'utiliserons que la formule de Gaddum.

Ainsi on peut déterminer l'intervalle de sécurité du titre : $\pm 2 \sigma$ ou $\pm 3 \sigma$, suivant que l'on prend un coefficient de sécurité de 0,95 ou 0,99. Dans les conditions habituelles de titrage avec des animaux, l'intervalle de sécurité du titre est de l'ordre de 1; l'erreur, par suite des fluctuations statistiques de la résistance des animaux, est beaucoup plus importante que l'erreur de dilution, que l'on peut négliger. Pour la réduire, il faut ou diminuer h , ou augmenter n , car s ne change guère lorsqu'on peut changer d'espèce animale sensible au virus : cela revient à augmenter le nombre d'animaux utilisés pour chaque titrage; ce nombre dépasse rarement 30, par raison de commodité et d'économie.

Un artifice de calcul, désigné sous le nom de méthode des totaux cumulatifs ou méthode de Reed et Muench, a été préconisé par divers auteurs (65, 27, 209) : on additionne toutes les réponses positives à partir de la concentration la plus faible pour laquelle il y en a encore et jusqu'aux concentrations les plus fortes et de même toutes les réponses négatives à partir de la concentration la plus forte pour laquelle il y en a et jusqu'aux concentrations les plus faibles; on détermine ensuite les pourcentages d'après ces totaux cumulatifs. Ce procédé de calcul ne change pas beaucoup la

valeur de la D.I. 50, car le pourcentage des réponses positives n'est sensiblement modifié qu'aux dilutions extrêmes. Mais il a un très grave inconvénient : il aplanit les irrégularités de la courbe, et peut dissimuler l'hétérogénéité de la sensibilité des animaux, qu'il faut vérifier auparavant d'après les pourcentages réels non cumulés. En tout cas, cet artifice de calcul n'augmente nullement la précision du titre.

L'utilisation de la courbe de titrage exprimée en probit a encore un avantage : dans un même laboratoire, pour un élevage d'animaux et pour une souche de virus bien déterminés, la droite garde une pente constante; on fait alors un titrage de référence avec un nombre très élevé d'animaux (50 ou plus) de façon à déterminer exactement les caractéristiques s et σ . Pour les titrages ultérieurs, on pourra se contenter de l'injection de deux dilutions à une vingtaine d'animaux, sans perdre en précision sur le titre. Il faut de temps en temps vérifier la constance de s et σ .

3. — *Utilisation des cultures cellulaires* *Méthode des plages*

Les cultures cellulaires ont pris un développement considérable dans les études sur les virus; actuellement les tissus d'organes d'un seul animal peuvent fournir des centaines de tubes et de flacons de cultures, dont la population est très homogène. Le virus peut se multiplier dans les cellules en culture, et s'il détruit les cellules, les tubes remplacent avantageusement les animaux pour les titrages : la réponse positive est la destruction des cellules. Il est facile de multiplier le nombre de tubes utilisés pour chaque titrage, d'où précision accrue.

Dulbecco et Vogt (68) ont appliqué aux virus la méthode de titrage utilisée pour les bactériophages par d'Hérelle (63) puis par Ellis et Delbrück (84) : l'application d'une suspension de bactériophages sur une colonie de bactéries sensibles en milieu solide, ou d'une suspension de virus sur une colonie de cellules sensibles en cultures en couche uniforme, produit un nombre discret de halos ou plages, témoignant de la destruction locale des bactéries ou des cellules. Dans les deux cas, le nombre des plages est fonction linéaire de la concentration de la suspension virulente. Pour Ellis et Delbrück, le nombre des plages est proportionnel au nombre des centres infectieux (foyers dans la suspension qui contiennent un ou plusieurs bactériophages). Mais Dulbecco et

Vogt ont cru pouvoir démontrer que chaque plage provenait d'une seule particule virulente, définie comme une unité non divisible par dilution, et pensent ainsi pouvoir isoler des clones de virus et dénombrer les particules de virus. La démonstration (p. 176) nécessite quelques remarques :

— La formule théorique donnant le nombre de plages se déduit de la loi de Poisson appliquée à la distribution de v particules parmi N cellules et, d'après les auteurs, s'écrit :

$$Pl = N \left(1 - e^{-\frac{a \cdot v}{N}} \right) \quad \begin{array}{l} a = \text{coefficient} \\ \text{d'efficacité} \end{array}$$

Le deuxième terme de l'égalité est la différence entre le nombre total des cellules et celui des cellules n'ayant reçu aucune particule : c'est donc le nombre total des cellules ayant reçu un nombre quelconque *égal ou supérieur à 1* de particules de virus.

— Pour transformer cette formule exponentielle en relation linéaire, les auteurs ajoutent sans explication : « Puisque nous sommes dans le cas où il y a un petit nombre seulement de plages

(inférieur à 50), c'est-à-dire que $\frac{a \cdot v}{N}$ est petit, l'équation se

ramène à $Pl = a \cdot v$ ».

De ce que le nombre de plages est petit, il ne s'ensuit pas obligatoirement que $\frac{a \cdot v}{N}$ soit petit, ou cela suppose admis ce qui fait

l'objet de la démonstration, à savoir que le nombre des plages est égal ou proportionnel à v , nombre de particules.

Le raisonnement de Dulbecco et Vogt n'est donc pas probant. Il ne pourrait, en tout cas, que démontrer qu'il faut au moins une particule pour provoquer une plage, mais on ne peut savoir quelles plages proviennent d'une seule particule, ou de plusieurs.

Luria (170), à partir d'une autre formule, avait aussi essayé de démontrer que chaque plage provenait de l'action d'un seul bactériophage; il trouvait qu'une suspension de bactériophages qui, diluée à 10^{-10} , provoque la lyse de 10^8 bactéries devrait contenir $10^{14.5}$ bactériophages au cm^3 pour que la probabilité qu'une bactérie reçoive deux bactériophages soit égale à 1. La formule utilisée ne peut être exacte, puisqu'ainsi à la dilution 10^{-10} il n'y aurait que $10^{4.5}$ bactériophages, nombre insuffisant pour que chacune des 10^8 bactéries soit infectée par deux bactériophages. La

démonstration reposant sur cette formule n'est donc pas concluante. Un peu plus loin, par application de la loi de Poisson, Luria arrive à la seule conclusion possible : il faut au moins une particule pour produire une plaque; mais à la fin il prétend abusivement que le nombre des plaques est égal au nombre des bactériophages.

Il semble que ce soit Parker (195) qui ait le premier essayé de prouver statistiquement par la loi de Poisson qu'une particule physique de virus pouvait créer l'injection : au cours d'inoculations intradermiques du virus de la vaccine au lapin, il avait cru établir que le pourcentage des lésions positives suivait la loi de Poisson, en supposant qu'une seule particule virulente provoque la lésion. Mais Haldane (101) montrait d'abord que le critère du χ^2 , contrôlant la validité de l'hypothèse, avait été mal appliqué, et que l'hypothèse ne concordait pas avec les faits. Puis Bryan et Beard (49) prouvaient, par la transformation en probit, que les résultats de Parker s'expliquent par la seule hypothèse d'une distribution normale de la sensibilité des animaux.

Tous ces raisonnements statistiques ne prouvent donc rien. On peut même faire une critique au principe de l'application de la loi de Poisson à la répartition de particules de virus parmi les cellules. En effet, pour qu'une loi soit valable, il faut que la probabilité qu'une particule de virus se fixe à une cellule soit constante, que la cellule ait déjà reçu ou non des particules virulentes. Or, il semble bien, d'après les travaux sur les phénomènes d'interférence entre virus, qu'une particule virulente a d'autant moins de chances de se fixer sur une cellule que celle-ci a déjà fixé davantage de particules de virus (blocage des récepteurs); la loi de Poisson ne peut donc pas s'appliquer.

D'ailleurs un volume identique de la même suspension virulente provoquera sur divers flacons d'une même culture cellulaire un nombre de plaques très variable; dans les rares cas où l'expérience ait été réalisée avec un nombre suffisant de flacons, on s'aperçoit que la distribution du nombre des plaques est normale (voir 2^e partie, A). Le titre d'une suspension exprimé par le nombre d'unités formant une plaque au cm^3 est donc soumis à des fluctuations statistiques, et l'erreur relative (coefficient de variation) est du même ordre de grandeur que celle du titre exprimé par le logarithme de $1/\text{D.I. 50}$ d'après un titrage sur tubes de cultures (voir 2^e partie, A).

4. — *Autres méthodes de titrage*

Quelques auteurs (48, 34, 93) ont utilisé une relation linéaire entre le temps d'incubation de la maladie ou son inverse et le logarithme de la concentration en virus; cette relation ne paraît pas être généralisable et elle est douteuse pour un des cas, l'auteur (34) ayant commis la même erreur que Parker (195) dans l'application du critère de concordance du χ^2 .

Pour les virus végétaux, on compte les lésions produites à la surface des feuilles de la plante sensible sur lesquelles on a répandu un volume donné de suspension virulente; le nombre des lésions est très variable d'une plante à l'autre et même d'une feuille à l'autre. Kleczkowski (128, 129) a montré que les résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une distribution normale de la dose virulente effective minimale, par suite de variations de résistance des cellules; il a préconisé divers changements de variable de façon à obtenir des courbes normales, mais ces transformations sont plus complexes que celle des probits et les résultats moins facilement exploitables.

Toutes ces méthodes ont en commun de faire appel au pouvoir pathogène des virus et sont sujettes à toutes les erreurs provenant d'une action extérieure sur le pouvoir pathogène ou sur la résistance des animaux ou des plantes : effet de la nourriture (237), de la voie d'inoculation (8), de la température (106), de la composition du milieu nutritif (2, 70, 96). Li et Jahnes (166), Li (165) sont arrivés, en étudiant une souche de virus poliomyélitique adaptée à la souris, à faire disparaître ou réapparaître la virulence pour la souris de façon réversible, uniquement en changeant la composition ou le pH du milieu nutritif ou le type de cultures cellulaires servant à l'entretien de la souche.

On a essayé de s'adresser à d'autres propriétés des virus; mais on ne peut qu'utiliser des caractères propres à certains virus : le pouvoir hémagglutinant du virus de la grippe (51), la visibilité des particules de virus de la vaccine au microscope à fluorescence (157), le dosage par spectrophotométrie de l'acide nucléique, constituant principal des virus végétaux (239). Mais ces méthodes ne sont pas généralisables, et sont sujettes à autant de causes d'erreurs que les méthodes courantes.

Ainsi toutes les méthodes de titrage des suspensions virulentes ne donnent de résultats comparables qu'à condition d'être toujours exécutées dans des conditions aussi identiques que pos-

sibles, car de petites variations des conditions expérimentales peuvent produire des écarts considérables entre les titres.

B. — MÉTHODES DE FILTRATION

La filtration est la méthode la plus ancienne. Qualitativement, l'utilisation de filtres retenant toutes les espèces microbiennes a permis de mettre en évidence l'existence des « virus filtrants » en 1892. Quantitativement, Bechhold (24) en 1907 fut le premier à préparer des membranes spéciales à l'aide de gels, à essayer d'en mesurer la porosité, et à s'en servir ensuite pour mesurer les virus. Elford (72) en 1931 mit au point une méthode empirique mais soignée de préparation des membranes (collodion dans un mélange d'alcool-ether) dont l'emploi s'est généralisé : membranes gradocol.

Le principe de la filtration est simple : il suffit de laisser passer la suspension virulente à travers des tamis appropriés (membranes) dont les ouvertures calibrées ne retiennent que les particules de taille supérieure.

Pour calibrer les membranes, on suppose que les pores sont des canaux cylindriques ou rectangulaires, perpendiculaires à la surface de la membrane. On calcule le diamètre des pores :

— par application de la loi de Jurin après avoir mesuré la pression nécessaire pour faire passer des bulles d'air à travers la membrane immergée dans un liquide connu ;

— par application de la loi de Poiseuille après avoir mesuré le débit de l'eau s'écoulant à travers la membrane dans des conditions connues. Cette méthode est la plus utilisée.

La valeur ainsi calculée est désignée sous le nom de diamètre moyen des pores (D. M. P.). Elle a été soumise à de nombreuses critiques (75, 113, 99) : les pores ne sont pas des canaux de section constante, l'aspect de la membrane au microscope optique aussi bien qu'électronique (108) est celui d'agrégats de collodion séparés par des interstices très irréguliers, rappelant plutôt une éponge qu'une filière ; on ne peut affirmer qu'il n'y a pas hydratation de la membrane ; la loi de Poiseuille n'est peut-être pas applicable. Elford et Ferry (81) estiment avec optimisme que le diamètre des pores est connu à 25 % près. Grabar (99) a étudié la dispersion du diamètre des pores d'une membrane : le D. M. P. représente bien une valeur comprise entre le diamètre maximal et

le diamètre minimal des pores, sans être réellement la moyenne
D. M. P.

des diamètres; le rapport $\frac{d}{d}$ est voisin de 1 (d = différence
entre les diamètres maximal et minimal).

De plus, au cours de la filtration il se produit des phénomènes électrostatiques entre les ions de la solution et les ions fixés au collodion (236); il peut y avoir aussi colmatage des pores par adsorption d'ions ou de particules sur les parois : on y remédie partiellement par l'utilisation de corps tensioactifs. La température, la pression exercée sur le liquide, le pH, la composition et la concentration du milieu à filtrer influencent aussi la filtration (75, 99, 58, 114). Ainsi, au cours de filtrations successives de suspensions virulentes sur des membranes de D. M. P. de plus en plus faible, le titre du filtrat diminue progressivement pour s'annuler à partir d'une certaine valeur du D.M.P., appelée point final de la filtration; ce point final est supérieur au diamètre des particules complètement retenues par la membrane. Le rapport du diamètre des particules au point final de la filtration est le facteur de correction qu'Elford (73) avait empiriquement essayé de déterminer en filtrant des suspensions de particules de taille connue, établissant des relations qui ont été ensuite appliquées dans presque toutes les études de filtration : le facteur de correction diminue avec le point final de filtration (0,33 à 0,5 pour 10 à 100 m μ ; 0,5 à 0,75 pour 100 à 500 m μ ; 0,75 à 1,0 pour 500 à 1.000 m μ).

Markham et coll. (178), reprenant les critères de détermination de ce facteur, concluent qu'il varie de 0,55 à 0,95 sans pouvoir mettre en évidence de relation entre le point final de la filtration et le facteur de correction.

Actuellement, on peut comparer les plus récentes déterminations du diamètre des virus sphériques, mesuré sur des micrographies électroniques de particules virulentes groupées ou lyophilisées pour diminuer l'aplatissement et la distorsion dus au séchage, aux anciennes études de filtration : on constate que les relations d'Elford sont inexactes, et que le facteur de correction est en moyenne de 0,73, paraissant être d'autant plus grand que le virus est plus petit (tableau 1). Ces valeurs du facteur de correction sont d'ailleurs systématiquement trop petites, puisque les dimensions des images du microscope électronique ne concernent

TABLEAU I
DIMENSIONS DES VIRUS SPHÉRIQUES
D'APRÈS LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
ET L'ULTRAFILTRATION

Virus	Microscope électronique		Filtration		Mic. élec.
	Diametre m μ	Référ.	Point final m μ	Référ.	Ultrafil.
Adénovirus	70	246	140	109	0,50
Coxsackie	28	180	46 30	184 112	0,61 0,93
Encéphalomyélite de la souris	27	164	27	242	1,00
Fièvre aphteuse	22	13	25	92	0,88
Grippe	80	259	160	79	0,50
Papillome du lapin	45	259	70	220	0,64
Poliomyélite	27	217	25	82	1,00
Anneaux du tabac	25	259	40	235	0,62
Nécrose du tabac	24	179	40		0,60
Rabougrissement de la tomate	30	259	40		0,75
					Moy. 0,73

que des virus déshydratés, donc plus petits que les particules de virus en suspension.

La filtration est une méthode qui permet d'étudier les virus dans leur état normal, sans déformation. Mais les résultats ne sont que relatifs, les causes d'erreurs étant inchiffrables. Si on sait d'autre part que les particules sont sphériques, on peut dire que leur taille est comprise entre la moitié et la valeur du point final de la filtration, celle-ci étant d'ailleurs connue à 50 % près. La taille des virus est ainsi déterminée à un facteur 2 ou 3 près.

C. — MÉTHODES DE SÉDIMENTATION

Les forces centrifuges furent d'abord utilisées qualitativement pour séparer les particules de virus du milieu dans lequel elles se trouvaient en suspension. Mais, tout en faisant tourner de plus en plus vite les centrifugeuses, on établit des théories plus ou moins empiriques permettant de déduire la taille de ces particules des variations du titre de la suspension au cours du temps. Puis on construisit des appareils mieux étudiés et on élaborâ une théorie générale de l'ultracentrifugation qui fournissait indirectement la taille des particules sans nécessiter de titrages.

1. — *Déterminations directes de la taille des virus*

a) Bechhold et Schlesinger (25) éliminent les particules de virus de la suspension au cours de la centrifugation, à l'aide d'une rondelle de papier filtre au fond des tubes à centrifuger. Ils admettent que le titre est le même dans tout le tube, le milieu étant brassé et homogénéisé par les courants de convection et les vibrations mécaniques de l'appareil; ils en déduisent que le titre décroît exponentiellement quand le temps croît et ils établissent une formule donnant le diamètre des particules supposées sphériques à partir de la détermination de la concentration C_t au bout de t minutes de centrifugation. Cette formule nécessite aussi la connaissance du volume spécifique du virus. Les résultats de cette méthode sont assez cohérents, et montrent que les suppositions faites sont réalisées. La principale réserve est la valeur élevée adoptée pour le volume spécifique des virus, 0,87 à 0,91 : elle conduit à des diamètres un peu forts pour les virus.

b) Elford (74) critiqua cette méthode donnant des résultats

nettement supérieurs à ceux de la filtration; il voulut éviter toute vibration et toute convection en employant un tube capillaire monté à l'envers dans un tube plus large. La formule qu'il établit détermine le diamètre en fonction d'une variable X , qui, toutes choses égales d'ailleurs, doit être proportionnelle au temps t de centrifugation. Or les essais d'Elford montrent que cela n'est vrai que si le rapport des concentrations au temps t , C_t , à la concentration initiale C_0 est supérieur à 0,1. Elford préconise d'établir expérimentalement la courbe du diamètre calculé en

fonction de $\frac{C_t}{C_0}$, et d'extrapoler jusqu'à $\frac{C_t}{C_0} = 1$ pour avoir la vraie valeur du diamètre. Comme la courbe a une forme inconnue

qu'il est impossible de tracer expérimentalement pour $\frac{C_t}{C_0} > 0,1$,

l'extrapolation est très subjective. Elford et Andrewes (78) appliquèrent cette technique sans faire d'extrapolation; les valeurs ainsi obtenues sont certainement beaucoup trop petites, l'erreur pouvant dépasser 60 %.

c) MacIntosh et Selbie (174) utilisent une centrifugeuse du type de celle de Henriot et Huguenard. Ils établissent que la

courbe du logarithme de $\frac{C_t}{C_0}$ en fonction du temps de centrifugation

est une droite dont la pente est proportionnelle au carré du diamètre des particules. Pour calculer ce diamètre, ils utilisent une relation qui est une modification de la loi de Stokes; cette modification non justifiée introduit une erreur systématique sans doute par défaut.

d) Schlesinger (219) puis Schlesinger et Galloway (221) modifiant légèrement la technique de Bechhold et Schlesinger, utilisent une centrifugeuse Sharples et des tubes recouverts intérieurement d'une couche mince d'agar pour retenir le virus. Ils attendent qu'un équilibre de sédimentation s'établisse, entre le virus éliminé de la suspension par les forces centrifuges et le virus remis en suspension par les forces de diffusion: le titre de la suspension reste alors constant.

Toutes ces méthodes procèdent à des titrages du surnageant: ceci nécessite l'arrêt de la centrifugation qui, aussi rapide soit-il,

modifie certainement l'état du système. De plus, les centrifugeuses utilisées n'étaient pas conçues pour des mesures : vibrations mécaniques, échauffement thermique d'où courants de convection. On s'attacha alors à mettre au point des appareils spécialement conçus pour ces études : rotors de forme spéciale, tournant dans une enceinte sous pression réduite d'hydrogène ou d'air pour réduire l'échauffement, vitesses de rotation élevées (accélérations supérieures à 100.000 g.), température maintenue constante dans des limites aussi étroites que possible; ce sont les ultracentrifugeuses entraînées soit par des turbines à jet d'huile, réalisées par Svedberg et son équipe, soit par des turbines à jet d'air réalisées par Beams, Pickels et Bauer; leur emploi est maintenant généralisé.

2. — *Ultracentrifugation. — Constante de sédimentation*

La théorie en fut développée principalement par Svedberg et coll. (238). Dans les rotors se trouvent des cellules dans lesquelles s'effectue la sédimentation; leurs parois sont transparentes pour permettre de suivre par des méthodes optiques les phénomènes au cours de la centrifugation. De la forme de la cellule, et de l'absence de toute convection, Svedberg établit que la concentration n'est pas uniforme dans la cellule : il existe une zone où le gradient de concentration est élevé : c'est la frontière de sédimentation, séparant la région où se trouve le milieu de suspension pur de la région où se trouvent les particules de virus en suspension. L'existence et le déplacement de cette frontière sont mis en évidence par des méthodes optiques :

— si les particules ont un pouvoir absorbant élevé pour une longueur d'onde déterminée, l'éclairement de la cellule par un faisceau de cette longueur d'onde se traduira par l'existence sur les clichés de deux zones, claire et sombre, séparées par une frontière plus ou moins diffuse. A l'aide d'un microphotomètre, on trace pour chaque photographie, la courbe de la concentration dans la cellule en fonction de la distance à l'axe de rotation. On détermine ainsi le déplacement de la région de concentration égale à la moitié de la concentration initiale.

— Lamm (134) utilisa la variation de l'indice de réfraction de la suspension avec la concentration. La méthode originale, modifiée par Tiselius et coll. (245) puis par Philpot (198), a abouti à l'enregistrement direct sur plaque photographique de la

courbe du gradient de concentration en fonction de la distance à l'axe; le sommet de cette courbe correspond à la zone de concentration

C_0

— dont on peut ainsi suivre le déplacement.

2

Svedberg a défini une grandeur, malheureusement baptisée constante de sédimentation : c'est la vitesse de déplacement des particules dans un champ centrifuge d'accélération égale à l'unité soit :

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x}$$

C_0

x = distance à l'axe de rotation de la zone de concentration ————
2

$\omega = 2 \pi N$ et N = vitesse de rotation (tours/seconde).

Comme s est fonction de la température, de la densité et de la viscosité du milieu de suspension, on ramène la valeur trouvée à celle qui correspondrait à des conditions précises : suspension dans un milieu de référence, l'eau pure, à la température de 20° C., soit :

$$s^{\circ}_{20} : \quad s^{\circ}_{20} = s \cdot \frac{\eta_t}{\eta^{\circ}_{20}} \cdot \frac{1 - V \cdot \rho^{\circ}_{20}}{1 - V \cdot \rho_t}$$

ρ_t, η_t : densité et viscosité du milieu à la température de l'expérience : t° C.

$\rho^{\circ}_{20}, \eta^{\circ}_{20}$: densité et viscosité de l'eau pure à 20° C.

V : volume spécifique du virus.

Bien que ramenée à des conditions identiques, s°_{20} n'est pas une constante : elle dépend du corps considéré; elle n'a même aucune valeur expérimentale, car si l'on faisait l'expérience dans les conditions de référence (eau pure à 20° C.), on trouverait une valeur très différente de s°_{20} .

La précision de s°_{20} n'est pas très grande, bien que certains aient prétendu mesurer cette constante à 0,5 %; ainsi dans un laboratoire utilisant une ultracentrifugeuse Spinco, entraînée par un moteur électrique, on trouvait des résultats systématiquement inférieurs de 9 % à ceux obtenus avec l'ultracentrifugeuse du type Svedberg. Ces différences, gênantes pour les auteurs (185, 241) déclarant atteindre une précision de 1 %, furent expliquées ensuite (231) quand on s'aperçut que la tempé-

rature dans la cellule, mesurée par le point de fusion d'un corps pur, pouvait être de 3° C. supérieure à celle indiquée par le thermocouple généralement utilisé, pour la centrifugeuse Svedberg; et Waugh et Yphantis (253) ont montré, par mesure du rayonnement du rotor, un abaissement de la température du rotor de 1° C. pendant l'accélération pour la centrifugeuse Spinco. Ces deux effets produisent donc un écart de 4° C. entre les deux machines, alors que les températures indiquées par les thermocouples seront identiques; comme la viscosité de l'eau varie de 2,5 % par degré aux environs de 20° C., cela suffit à expliquer ces différences de 9 %. Si les expériences, conduites par le même auteur avec le même appareil dans les mêmes conditions, peuvent donner des résultats identiques à 1 % près, il ne s'ensuit pas que s_{20}^0 soit connu à 1 % près; un simple calcul d'erreurs, comme l'a fait Slizewicz (232), le montre.

Trop de facteurs, négligés par la théorie, contribuent à fausser les valeurs absolues des résultats, sans influencer la reproductibilité des mesures. Ainsi, on a constaté que s_{20}^0 , contrairement à la théorie, dépend de la concentration en virus de la suspension : cela ne fait que traduire l'existence d'interactions des particules, négligées par la théorie établie pour des solutions idéales ou très diluées. Pour assurer la constance de s_{20}^0 , divers auteurs (136, 216, 130) ont préconisé des corrections tenant compte soit de la viscosité du milieu, soit de l'hydratation des particules. Mais en général, on convient d'extrapoler la courbe de s_{20}^0 en fonction de la concentration, et de donner comme résultat la valeur extrapolée jusqu'à une concentration nulle; comme on ne sait pas quelle doit être la relation théorique entre s_{20}^0 et la concentration, les auteurs adoptent des formules diverses (185, 98, 1) assez subjectives.

De même, on admet qu'il n'y a aucun brassage de la suspension pendant la centrifugation; or, malgré les précautions, il y a échauffement du rotor : personne n'a jamais fait de mesures précises de la distribution de la température dans le rotor pour pouvoir affirmer qu'il n'existe aucun gradient de température, alors qu'on peut calculer qu'il suffit d'une variation théorique de 10⁻⁸ degré entre deux régions de la suspension pour produire des courants de convection de vitesse comparable à la vitesse de sédimentation des virus, et qu'on sait qu'entre la cellule et la base du rotor il peut y avoir 3° C. de différence. De plus, aux vitesses couramment réalisées, il règne dans la cellule des pres-

sions très élevées, supérieures à 300 kg./cm², qui sont plus grandes dans le fond qu'à la surface : la viscosité de la suspension et sa densité ne sont plus uniformes; cela se traduira par des courants dans le milieu.

Les phénomènes d'ionisation, le pH ont aussi un effet (141) dont la théorie est seulement esquissée. Pour le diminuer, on utilise des milieux tampons, et on se place au voisinage du point iso-électrique. C'est pourquoi la sédimentation dans de l'eau pure, ni même dans des solutions salines très diluées ne peut être envisagée, et que s^{∞} n'a aucune valeur expérimentale.

3. — *Volume spécifique des virus*

Dans tout essai de mesure des virus par une méthode de centrifugation quelconque, il faut connaître le volume spécifique. Celui-ci peut se calculer d'après la pente de la courbe du poids de suspension virulente contenu dans un picnomètre en fonction de la concentration. Cette méthode n'est pas souvent applicable aux virus, car elle nécessite la connaissance de la concentration en poids, qui ne peut être déterminée qu'avec des produits purs et secs.

De la formule de Stokes utilisée par la théorie de la centrifugation, on déduit que s est nul lorsque $1 - V\rho = 0$ ou $V = \frac{1}{\rho}$.

Ainsi dans un milieu de densité convenable, les particules ne sédimenteront jamais quelle que soit la force centrifuge appliquée. En augmentant la densité de la solution par addition de glucose ou de sucre, divers auteurs (74, 174, 221) ont ainsi déterminé le volume spécifique des virus. Un procédé original consiste à faire la sédimentation dans une solution d'eau lourde (154).

Une méthode de principe voisin consiste à mesurer s dans deux suspensions de densité différente, et à tirer V du système de deux équations à deux inconnues, liant s , V et r^2 , carré du rayon des particules (74, 26). Mais Smadel et coll. (233) pour le virus de la vaccine, Sharp et coll. (230) pour le virus de la grippe, et Schachman et Lauffer (215) pour le virus de la mosaïque du tabac constatent des variations aberrantes de s en fonction de la densité des solutions. Ceci a suggéré l'hypothèse de la variation du volume de l'eau liée au virus par suite de la modification de

la pression osmotique, provoquée par l'augmentation de la quantité de corps dissous; l'hydratation des virus (137) modifie le rayon des particules, donc la résistance visqueuse au déplacement, tandis que la force centrifuge ne dépend que de la densité des particules. Donc l'hydratation modifie la constante de sédimentation, ce qui explique les variations aberrantes de s en fonction de ρ . Mais les hautes pressions régnant dans la cellule pourraient aussi modifier l'hydratation des particules et agir ainsi sur s .

Pour les virus, le volume spécifique V varie de 0,7 à 0,8, l'erreur relative étant de l'ordre de 5 à 10 %. Souvent même, on donne plusieurs valeurs calculées d'après différentes expériences.

4. — Dimensions et masse des particules

En supposant les particules sphériques de rayon r , de volume spécifique V , dans un milieu de densité ρ et de viscosité η , on a, par application de la formule de Stokes :

$$s_{20}^{\circ} = \frac{2}{9} \cdot \frac{1 - V \cdot \rho}{\eta V} \cdot r^2$$

La précision de r dépend donc beaucoup de la prévision de V ; comme V est connu approximativement, r n'est calculé qu'à 20 à 40 % près. Souvent on donne diverses valeurs de r , suivant les valeurs de V .

La théorie de la centrifugation a été très appliquée à l'étude des protéines. Pour celles-ci, qui sont des corps purs au sens chimique du terme, on peut parler de masse moléculaire ou de molécule-gramme; on déduit cette molécule-gramme M , caractéristique plus intéressante que le diamètre, des mesures de s jointes aux déterminations du coefficient de diffusion D :

$$M = \frac{R \cdot T}{D (1 - V\rho)} \cdot s_{20}^{\circ}$$

R = Constante des gaz parfaits T = Température absolue

Pour les virus, qui ne sont pas des corps purs, c'est-à-dire composés d'une seule espèce de molécules, on ne peut pas parler de molécule-gramme; mais par analogie, on calcule M qui est la masse de N (nombre d'Avogadro) particules, et n'a aucune des propriétés de la molécule-gramme.

M n'est calculé qu'approximativement, car le coefficient de diffusion est très difficilement mesurable: il s'agit de suivre la variation de concentration au cours du temps, dans deux suspen-

sions superposées, de concentration initiales différentes; on le fait soit par la méthode réfractométrique de Lamm (134), soit par prélèvements et titrages (42). Northrop et Anson (7) utilisent un disque poreux, à l'intérieur duquel se fait la diffusion: ici comme pour les membranes filtrantes, la forme irrégulière des canaux provoque une erreur inchiffable mais importante. La théorie de la diffusion de Nernst assimile les molécules dissoutes à celles d'un gaz parfait, et ne s'applique donc qu'aux solutions très diluées, sans interactions moléculaires. Toutes ces causes d'erreurs expliquent que la valeur de D varie de 50 % ou plus, d'une méthode à l'autre. Comme V est aussi approximatif, on ne connaît qu'un ordre de grandeur de M , à un facteur 2 près.

Archibald (9, 10) reprenant la question du point de vue théorique, écrit que la quantité de matière traversant le haut ou le bas de la cellule est nulle à tout instant. Il montre ainsi que les courbes :

$$\frac{1}{\omega^2 x} \frac{dn}{n dx} = f(x)$$

n = concentration dans la cellule à la distance x de l'axe de rotation

se recoupent en deux points d'abscisse $x = x_a$ (haut de la cellule)

$$M(1 - V\rho)$$

et $x = x_b$ (bas) et d'ordonnées identiques égales à $\frac{R \cdot T}{M(1 - V\rho)}$

d'où M sans connaître ni s ni D . Ces études ont donné lieu par la suite à divers essais (127, 47, 126); les résultats sont aussi précis que ceux obtenus par la méthode de Svedberg, et les causes d'erreurs sont les mêmes.

5. — Dissymétrie et hydratation des particules

Connaissant M , on peut calculer le rayon de la sphère de masse équivalente à M/N , de volume spécifique V . La formule de Stokes permet alors de calculer la résistance visqueuse opposée à cette sphère équivalente se déplaçant avec la vitesse unité, soit f_0 . La détermination de s et de M donne la valeur expérimentale de cette résistance :

$$f = \frac{M(1 - V\rho)}{s^{0.30}}$$

Le rapport f/f_0 , appelé rapport ou constante de dissymétrie, confirme l'hypothèse de la sphéricité des particules s'il est de l'ordre de 1. Sinon, la particule est allongée en forme de bâtonnet, ou bien elle est hydratée, ce qui diminue aussi s . On utilise parfois les formules établies par Perrin, dans l'étude du mouvement brownien, pour déduire de cette valeur f/f_0 le rapport des axes de l'ellipsoïde de révolution équivalant à la particule de virus. L'étude de la viscosité ou de la biréfringence d'écoulement, ainsi que la microscopie électronique fournissent aussi des valeurs de ce rapport des axes, qui ne sont pas identiques, car l'hydratation intervient.

Si l'on peut mesurer la densité du virus sec, par exemple à l'état cristallisé, on calcule la quantité d'eau liée au virus en suspension responsable de la différence entre cette densité et $1/V$ qui représente la densité du virus en suspension. Mais on n'obtient que des approximations qui varient notablement suivant les conditions expérimentales, variations d'origine mal connue. Il est plus intéressant de comparer la masse des particules à la masse qu'on peut déterminer par la microscopie électronique, qui correspond à celle d'un virus déshydraté : on calcule ainsi la quantité totale d'eau liée ou incorporée au virus.

Les renseignements qu'on obtient sur l'allongement des particules et leur degré d'hydratation d'après les résultats de l'ultracentrifugation et de la diffusion sont des ordres de grandeur intéressants à comparer à ceux fournis par d'autres techniques : ceci permet de se faire une idée de l'influence des conditions extérieures sur la forme et la taille des particules.

L'étude de la sédimentation fournit donc des résultats plus précis que la filtration, et plus détaillés ; la principale cause d'erreur provient de l'imprécision de V , et quand on l'utilise, du coefficient de diffusion ; l'erreur sur s°_{20} est généralement de l'ordre de 10 %, tandis que le rayon et la masse des particules sont connus avec une erreur relative de 20 à 50 %. La forme et l'hydratation des particules sont plus approximatives.

Au fur et à mesure que la théorie de la sédimentation se complètera, que les déterminations expérimentales pourront être plus précises, les possibilités des ultracentrifugeuses augmenteront ainsi que leur champ d'application et elles permettront une analyse plus fine de la structure des virus et des découvertes certainement encore plus intéressantes.

D. — MÉTHODES DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Le microscope électronique, dont la première réalisation date d'un quart de siècle environ, a déjà suscité d'innombrables travaux. Car il a le mérite de fournir une image qui, s'adressant directement à nos sens, nous convainc davantage que le résultat de méthodes indirectes basées sur des théories plus ou moins approchées; c'est aussi un danger, car cette image peut ne pas représenter le réel, et malgré tout on est tenté d'y croire. Aussi l'interprétation des images doit être prudente, sans que l'on perde de vue les nombreuses sources de déformation inhérentes aux techniques de la microscopie électronique.

Par la valeur de la longueur d'onde associée aux électrons accélérés par des tensions de 50 à 100 kV, le microscope électronique devrait avoir un pouvoir de résolution 1.000 à 10.000 fois supérieur aux meilleurs microscopes optiques. En fait, étant donné les nombreuses imperfections dont il souffre encore, le champ d'application du microscope électronique s'étend aux objets de 1 à 500 m μ environ; par une heureuse coïncidence, ceci couvre exactement le domaine des dimensions des virus connus.

Les plus petits virus furent les premiers photographiés : mosaïque du tabac (121), fièvre aphteuse (11), puis la plupart des virus végétaux et des virus animaux. Ces images confirmaient directement la forme de bâtonnet attribuée au virus de la mosaïque du tabac par les méthodes indirectes; elles révélaient aussi la diversité des formes des virus. Mais le contraste des particules était très faible, car il est fonction croissante du numéro atomique des atomes composant l'objet, principalement des atomes légers pour les objets biologiques; leurs contours étaient mal définis, et leurs dimensions aussi.

1. — Métallisation des particules

Williams et coll. (268, 262) ont préconisé une technique qui s'est révélée sans égale pour visualiser les particules : ils provoquent, par sublimation sous pression très faible, le dépôt d'un mince film métallique suivant une projection rectiligne dans une direction oblique sur l'objet; les parties recouvertes par le métal, de numéro atomique élevé, seront opaques aux électrons, et le relief des objets proviendra d'une « ombre » claire, là où le métal

ne s'est pas déposé. La forme et la hauteur de l'ombre donnent la configuration spatiale des particules. Cette métallisation, intéressante pour observer des particules isolées, est au contraire nuisible à l'observation de la structure interne de l'objet, quand on étudie le développement intracellulaire des virus. Ce dépôt modifie aussi la taille et l'aspect superficiel des virus : leur diamètre augmente, et ils présentent une structure superficielle boursouflée; ces effets ont été discutés par Kahler et Lloyd (120), Kern et Kern (123), Williams (260), sans qu'on en identifie la cause certaine.

2. — *Distorsions provoquées par le vide*

Les objets, dans le microscope, sont sous une pression très faible (environ 10^{-3} mm. Hg). L'eau de la goutte de suspension à examiner s'évapore, la concentration en sels augmente, ceux-ci restant comme impuretés qui masquent le virus. Le lavage préalable des préparations dans l'eau distillée soumet les particules à un choc osmotique : les changements de concentration saline sont nuisibles à l'intégrité des particules, provoquant des modifications importantes, et même des éclatements (21, 227, 116, 6, 5). Backus et Williams (17) utilisent, comme milieu salin de suspension, une solution de sels volatils, acétate ou carbonate d'ammonium, évitant ainsi le lavage; Sharp et Beard (226) provoquent par centrifugation le dépôt des particules sur une couche d'agar qui absorbe les sels, puis ils entraînent les seules particules avec un film mince d'un vernis.

Au cours du séchage, les forces de tension superficielle favorisent l'agglomération des petites particules autour des débris ou des particules plus grosses (5), ce qui a produit de fausses interprétations (271). Ces forces, très élevées, provoquent un aplatissement important des particules, principalement si elles sont hydratées, d'où un diamètre apparent supérieur au diamètre réel (4). Anderson (3) y remédie en supprimant la surface de séparation entre l'état liquide et l'état gazeux, donc les forces de tension superficielle, par remplacement de l'eau par du CO_2 liquide et élévation de la température au-dessus de celle du point critique du gaz carbonique. Williams (258) a perfectionné la méthode de Richard et coll. (211) consistant à lyophiliser l'objet : sublimation sous vide de la glace de l'objet congelé. La première méthode, parfaite du point de vue théorique, est assez longue et nécessite le passage de l'objet dans divers bains, après fixation,

qui l'altèrent peut-être. La deuxième méthode est très rapide, et conserve l'objet dans sa situation initiale, bien qu'une faible déformation soit possible. Les deux méthodes ont le mérite de fournir des images de particules sphériques dont la hauteur égale le diamètre, ce qui n'était pas le cas pour les préparations séchées à l'air : Williams a calculé que le volume des particules reste constant, la diminution de hauteur étant compensée par une augmentation du diamètre (259). Appliquées toutes deux aux bactériophages (4, 265), ces méthodes ont révélé l'aspect polyédrique et non sphérique comme on le croyait, des têtes des bactériophages T de E. Coli.

3. — *Distorsions dans le microscope*

Le bombardement électronique auquel sont soumis les objets dans le microscope peut élever leur température à 400 ou 500° C.; de nombreux éléments légers se subliment et il subsiste seul un squelette carboné de l'objet. On s'en aperçoit car la déformation n'affecte que l'objet et non point son ombre qui reste ainsi le témoin de son aspect antérieur. Il faut donc éviter des densités électroniques élevées dans l'objet, car pour les préparations non ombrées, on ne peut distinguer la distorsion de ce type.

4. — *Identification des particules de virus*

L'examen au microscope électronique de suspensions virulentes ne suffit pas à identifier les particules virulentes; même si l'on ne distingue qu'une seule classe de particules de même taille et d'aspect identique, il ne s'ensuit pas que ce sont des corpuscules élémentaires de virus. Il faut prouver qu'il y a corrélation entre le nombre de particules visibles et le titre virulent; en conséquence, les suspensions témoins non infectées doivent en être totalement exemptes.

Backus et Williams (17) ont préconisé une méthode très élégante de numération des particules, évitant que l'observateur ne choisisse subjectivement les champs de la préparation : ils pulvérisent un très fin brouillard de microgouttes d'un mélange de la suspension virulente à étudier et d'une suspension de particules de forme et de taille connues, des particules de polystyrène ou latex (256); le champ d'observation est ainsi délimité par les contours des gouttelettes nettement visibles. En comptant

les particules de référence et les particules supposées de virus, connaissant la densité numérique de la suspension de latex, on en déduit la concentration en particules de virus. Il faut s'assurer que les impuretés ne peuvent masquer les particules ou se confondre avec elles, et que les deux types de particules n'exercent aucune interaction pour que le champ représenté par chaque gouttelette soit représentatif du mélange originel. Cette méthode est applicable à des suspensions relativement impures (16) et de concentration beaucoup trop faible pour pouvoir utiliser d'autres méthodes (centrifugation, filtration, diffraction des rayons X).

Une application fréquente en a été la détermination du nombre de corpuscules de virus visibles, existant dans la D.L. 50 ou dans la dose provoquant la formation d'une plage pour vérifier si le nombre des plages était égal au nombre des corpuscules; les résultats sont très variables suivant les virus, et les méthodes de titrage: le rapport du nombre des corpuscules au nombre des plages est de 1,5 à 2 pour certains bactériophages T de *E. Coli* (172), varie de 850 à 3.000 (217) ou de 36 à 260 (223) suivant les cultures cellulaires utilisées pour le titrage du virus poliomyélitique, est de 50 à 100 pour le virus vaccinal (69), varie de 33 à 1.600 pour le virus de la fièvre aphteuse (13). Ces variations ne sont pas étonnantes, et il n'est pas nécessaire de faire des distinctions entre particules de virus complets et incomplets, ou entre cellules susceptibles et non susceptibles d'une même culture. Nous avons montré que les raisonnements statistiques de Parker (195), Luria (170), Dulbecco et Vogt (68) n'étaient pas exacts: le nombre de particules de virus présentes dans la dose minimale suffisante pour déclencher l'infection ou la formation d'une plage est au minimum égale à 1; c'est évident sans aucun calcul; mais il peut être beaucoup plus élevé, et divers facteurs pouvant provoquer la formation ou la rupture d'aggrégats de particules, tels que le pH, la concentration saline, la composition du milieu modifient la répartition numérique des particules dans les différentes doses lors des titrages. La preuve en est fournie dans le travail de Luria et coll. (172): le nombre des corpuscules de bactériophages visibles au microscope électronique restant inchangé, le nombre des plages provoquée par une suspension est multiplié par 2, simplement par passage dans l'eau distillée ou addition de $ZnCl_2$; on ne peut l'expliquer par une différence entre particules de virus ou entre bactéries. Il est plus simple d'admettre que chaque corpuscule de virus peut

produire une plage, mais que suivant certaines conditions d'environnement, une fraction des plages provient de plusieurs corpuscules qui sont groupés.

5. — *Détermination de la masse des particules*

La méthode de Backus et Williams (17) permet en outre de déterminer la masse des corpuscules de virus, si l'on connaît la densité de la suspension virulente suffisamment purifiée; Williams et coll. (263, 264) ont ainsi calculé la masse de la particule de virus du rabougrissement de la tomate, et de la particule « monomère » de virus de la mosaïque du tabac, de longueur 298 m μ (267). Contrairement aux méthodes de sédimentation, aucune hypothèse n'est nécessaire pour ce calcul; cette masse se rapporte évidemment à la particule complètement déshydratée, inférieure à celle calculée par l'ultracentrifugation.

6. — *Détermination de la taille des particules*

La détermination des dimensions des images des corpuscules est sujette à deux causes d'erreur principales. La première provient des franges de diffraction (111) entourant l'image d'un halo clair ou foncé quand la mise au point n'est pas correcte et augmentant le contraste et les dimensions de l'objet. Etant donné le faible contraste naturel des objets biologiques, il est parfois difficile de réaliser la mise au point correcte, autrement que par une série de photographies prises en faisant varier progressivement la focale de l'objectif. L'erreur n'est pas négligeable, car, comme l'écrit Williams (261), alors qu'il est impossible de déceler une structure périodique sur les images électroniques correctes des virus, notamment celui de la mosaïque du tabac, il est très facile d'en apercevoir si l'image n'est pas au point; et la structure signalée par certains auteurs sur leurs images électroniques n'est qu'un artefact.

L'autre cause d'erreur, dont un seul article (267) déclare avoir tenu compte, à notre connaissance, est la distorsion de l'image produite par l'aberration sphérique des lentilles; elle peut être importante, surtout aux faibles grossissements, de 5.000 à 10.000, lorsque l'image est éloignée du centre du champ: elle dépend des microscopes, et de l'ouverture du faisceau électronique; l'erreur sur les dimensions qui en résulte dépasse

parfois 50 %. C'est une des raisons de la divergence des résultats concernant la longueur de la particule « monomère » du virus de la mosaïque du tabac, ajoutée aux phénomènes d'agglomération ou de rupture des particules par les traitements de purification.

Compte tenu de ces causes d'erreurs, les mensurations des particules isolées ne sont faites qu'à 3 à 5 $m\mu$ près. Mais il est préférable de mesurer les particules accolées en groupes compacts, l'aplatissement dû au séchage, l'erreur provoquée par l'ombrage sont ainsi réduits au minimum; les valeurs ainsi déterminées sont égales aux dimensions des particules lyophilisées (260), et sont connues à 2 ou 3 $m\mu$ près. Les images des cristaux de virus (133, 205), particulièrement spectaculaires, révèlent la régularité de forme et de dimensions des corpuscules de virus, formant un assemblage régulier et compact dans les trois dimensions de l'espace remplissant ainsi le volume d'un polyèdre dont la diffraction des rayons X avait précisé la configuration. La régularité et la constance des dimensions justifient le rôle d'étalon de mesure qu'a rempli le bâtonnet de virus de la mosaïque du tabac.

7. — *Multiplication intracellulaire des virus*

Le microscope électronique est le seul procédé d'étude du développement intracellulaire des virus. On peut en outre espérer qu'à l'intérieur des cellules les particules de virus seront moins altérées, et que leur structure interne sera visible. Toute une technique s'y est attachée.

La pénétration des électrons accélérés par des tensions inférieures à 100 kV étant faible, on ne peut examiner d'objets, même biologiques, d'épaisseur supérieure à 500 $m\mu$ environ. Il a donc fallu les couper en tranches fines, après les avoir fixés, déshydratés et inclus dans un matériau de soutien. On fixe les tissus ou les cellules à l'aide de l'acide osmique, qui est en outre l'équivalent d'un colorant pour le microscope électronique, car l'acide osmique est réduit en osmium métallique dans les tissus, et augmente localement l'opacité de l'image; Bahr (18, 19) a étudié les réactions de l'acide osmique avec diverses solutions de composés biologiques, et différents tissus, concluant que le noyau et les acides nucléiques ne sont pas fixés; Gibbons et Bradford (95) le confirmaient sur des coupes cellulaires. Hall (102) a cherché si l'acide osmique ou l'acide phosphotungstique augmen-

tait le contraste des particules de virus de la mosaïque du tabac et du rabougrissement de la tomate; dans les conditions habituelles d'utilisation, ces fixateurs n'ont pas d'effet sensible, mais à un pH inférieur à 2 le contraste est augmenté en même temps que le volume des particules. Il semble d'ailleurs qu'on n'ait pas encore trouvé d'atomes ou d'ions qui se fixent électivement sur les virus à l'exception du calcium qui s'attache apparemment à la périphérie des particules de virus de la grippe (240) et peut-être à d'autres virus (228, 229). On a commencé depuis peu à essayer d'autres composés d'atomes lourds pour leur affinité vis-à-vis d'un constituant cellulaire particulier; on a proposé l'acide phosphotungstique (103), l'acide chromique (168), le chlorure ferrique (31), le permanganate de potassium (169) avec des résultats variés. De ces travaux, on peut conclure qu'aucun fixateur ou colorant ne servira de panacée; on créera ainsi une histochimie électronique, en établissant la liste des composés destinés à mettre en évidence telle ou telle partie de la cellule; on pourra procéder à des comparaisons et des recoupements et déterminer si certaines formations sont des artefacts dus à l'acide osmique. Actuellement, faute de points de comparaison avec les résultats provenant d'autres méthodes de fixation ou de coloration des cellules, on ne connaît pas exactement l'influence de la fixation sur l'aspect des cellules.

Un autre point non résolu est celui du matériau d'inclusion : on a longtemps utilisé uniquement les méthacrylates de butyle et de méthyle qui, liquides à l'état de monomère, se solidifient en polymérisant soit par l'action de la chaleur, soit par l'action du rayonnement ultraviolet. Puis, avec l'expérience, on s'aperçut que dans certains cas, l'apparence des cellules était profondément modifiée, suggérant un éclatement des tissus dont on attribua bientôt la cause à la polymérisation du méthacrylate. Pour Borysko (41), un des promoteurs de l'utilisation du méthacrylate, il s'agit de forces internes entre régions plus ou moins polymérisées, donc plus ou moins visqueuses, le remède consistant à pré-polymériser le méthacrylate, à élever la température de polymérisation, et à agiter mécaniquement. Pour Charbonnier et Foucault (53), ces phénomènes disparaissent quand on utilise un catalyseurs chimiquement pur. Pour Moore et Grimley (187), il faut éliminer l'eau et l'oxygène dissous dans le méthacrylate qui inhibent la polymérisation. Il se peut que toutes ces raisons coexistent et ne soient pas les seules; et de faibles distorsions

ne seront pas remarquées. Aussi la seule méthode consiste à comparer l'aspect des cellules traitées identiquement, mais incluses dans des matériaux différents : les structures qui se retrouvent identiques dans tous les cas correspondent à une réalité de la cellule. Quelques tentatives d'inclusion dans un autre matériau ont été réalisées : Kellenberger et coll. (122) utilisent un mélange d'esters maléique et fumarique appelé Vinox, tandis que Glauert et coll. (97) préconisent l'emploi de résines époxydes connues sous le nom d'Araldite. Un long travail de comparaison doit être poursuivi avant que l'on soit fixé sur leurs avantages ou leurs inconvénients respectifs.

Les blocs de cellules inclusés dans le matériau choisi sont à couper en tranches fines à l'aide de microtomes; les microtomes ordinaires furent d'abord utilisés, puis on construisit des appareils spéciaux, baptisés ultramicrotomes, étudiés pour l'obtention de coupes plus minces, dites ultrafines. Comme le bloc de tissu à découper est très petit et de résistance mécanique faible, le couteau produit inévitablement une compression, qui déforme les particules intracellulaires sphériques en ellipses (191). Morgan et coll. (189) ont signalé qu'il y avait solution de continuité entre des coupes adjacentes; Williams et Kallman (266) ont montré que le couteau arrache du matériel, d'où impossibilité de suivre les structures sur des coupes successives.

Au début, on dissolvait le matériau d'enrobage pour métalliser les coupes avant l'examen; mais, outre l'inconvénient d'obscurcir tous les détails de structure interne, on s'est aperçu que les éléments cellulaires se trouvaient isolés sans soutien, et étaient complètement disloqués par les forces de tension superficielle lors du séchage (194, 110, 188). Aussi maintenant les coupes sont examinées telles quelles, sans aucun traitement. Mais dans le microscope, le bombardement électronique chauffe les coupes et le matériau d'enrobage se sublime; on ne peut l'empêcher et si l'échauffement est trop brutal, il produit des distorsions (191). Watson (252) recouvre les coupes d'un film de collodion pour éviter cette distorsion.

L'identification des particules de virus à l'intérieur des cellules est encore plus difficile à assurer que pour les suspensions purifiées. Comme on peut faire des centaines de coupes à travers une même cellule, au microscope électronique on n'observe qu'un nombre restreint de cellules différentes, qui n'est pas toujours représentatif du tissu infecté, composé parfois de plusieurs types

de cellules, qui ne sont pas toutes détruites par le virus. Aucun signe particulier ne permet de distinguer au microscope à quel stade de l'infection sont les cellules; on a imaginé de nombreux processus du développement intracellulaire des virus d'après les images électroniques, mais ce ne sont que des hypothèses non démontrées jusqu'à présent. Aussi les cultures cellulaires sont-elles d'un grand intérêt, car toutes les cellules sont du même type et l'observation de coupes de quelques cellules sera plus représentative de l'ensemble de la culture.

Pratiquement, le seul critère utilisé pour identifier les particules intracellulaires de virus est leur taille et leur forme; or, les particules de la vaccine, dont la forme de brique est considérée comme caractéristique dans les suspensions purifiées, se présentent sous forme de cercles ou d'ellipses entourés d'une membrane à l'intérieur des cellules; et la taille des particules est très variable suivant le niveau de la coupe. Il faudrait faire des coupes de particules de virus de suspensions purifiées pour contrôler si leur aspect est identique à celui des particules considérées comme le virus dans les coupes de cellules.

L'absence d'atomes ou d'ions métalliques se fixant électivement sur les virus, équivalents de colorants histochimiques, est particulièrement regrettable. On a cependant procédé à la comparaison de coupes minces, pour l'examen au microscope électronique, avec des coupes plus épaisses, colorées pour l'examen au microscope optique, obtenues successivement: dans les coupes de cellules HeLa infectées par les adénovirus, les régions du noyau où l'on observe des groupes réguliers compacts de particules montrent les réactions de coloration de l'acide désoxyribonucléique (33).

Les observations qualitatives au microscope électronique doivent être accompagnées d'une étude quantitative pour pouvoir préciser la succession chronologique des phénomènes de destruction cellulaire, et de multiplication du virus; il faut dénombrer les particules dans leurs différents aspects, et suivre la variation de leurs pourcentages respectifs au cours du temps. De cette façon Levinthal et Fisher (163) ont pu montrer qu'un certain type de particules, aisément reconnaissables sur les photographies électroniques de *E. Coli* infectées par le bactériophage T2, était un précurseur des particules de bactériophages. Les bactéries et leurs phages se prêtent à une telle étude quantitative, car la population est très homogène, et, si l'inoculation a

été suffisamment massive, la majorité des bactéries se trouve infectée, et au microscope électronique on observera certainement des bactéries en voie de dégénérescence, représentatives de l'ensemble de la population.

Il en est de même pour les cultures cellulaires, alors que les tissus prélevés sur des animaux infectés sont beaucoup plus complexes, ce qui rend très difficile toute étude quantitative. Le problème du développement intracellulaire des virus reste encore entier, mais de nombreux travaux ont déjà frayé les voies d'approche. La technique de la microscopie électronique se révèle sans égale dans ce domaine, et permettra certainement une meilleure connaissance de la structure et de la morphologie des virus.

E. — MÉTHODES DE MESURE PAR LES RAYONNEMENTS ET LE BOMBARDEMENT CORPUSCULAIRE

L'action des rayonnements ou des corpuscules émis par les corps naturels, radio-actifs ou les accélérateurs est variée. On peut cependant considérer deux types principaux d'interactions des rayonnements et des virus :

— Action des rayonnements sur les virus : elle se traduit toujours par la disparition, la transformation ou l'apparition d'une ou plusieurs propriétés des virus.

— Action des virus sur les rayonnements : un assemblage régulier et homogène dans l'espace de particules, atomes ou virus, perturbe la propagation d'un rayonnement électromagnétique régulier et homogène comme un faisceau monochromatique de rayons X; sa direction est déviée : on a une diffusion ou une diffraction du faisceau.

1. — *Action des rayonnements sur les virus*

Les études quantitatives ont concerné surtout l'action des rayonnements sur le pouvoir infectieux des virus, qui est plus ou moins rapidement détruit. Elles ont confirmé la règle de Baker (20) : la vitesse d'inactivation du virus est à tout instant proportionnelle à la concentration de virus qui est encore infectieux

$$\frac{dn}{dx} = -k \cdot n$$

ou sous la forme intégrale :

$$L \frac{n}{n_0} = -k \cdot x \quad \text{ou} \quad \frac{n}{n_0} = e^{-kx}$$

x = dose de radiation après laquelle le titre de la suspension est n , si le titre initial était n_0 ; k est une constante.

Cette loi est la justification de la théorie de la cible suggérée par Crowther (60) puis Condon et Terrill (54) : on admet que l'inactivation, ou plus généralement la modification d'une propriété du virus, est provoquée par la libération d'une quantité d'énergie unitaire, ou quantum, à l'intérieur d'un certain volume, dit volume sensible, de la particule. Ce quantum n'est pas le quantum énergétique de la théorie de Planck. Si l'on admet la loi de distribution de Poisson pour la répartition des quanta dans l'espace, et qu'un seul quantum inactive le virus, on trouve que la proportion des particules encore virulentes est celle des particules n'ayant reçu aucun quantum, soit :

$$\frac{n}{n_0} = e^{-N \cdot v}$$

N = nombre moyen de quanta libérés par unité de volume pendant toute l'irradiation.

v = volume sensible.

a) *Radiations et corpuscules ionisants.*

Le quantum énergétique correspond à la production d'une paire d'ions dans le volume sensible. Lea (143) définit la dose d'inactivation : c'est la dose de radiation telle que

$$\frac{n}{n_0} = e^{-1} = 0,37$$

ce qui signifie, d'après la loi de distribution des quanta, qu'une seule paire d'ions en moyenne est produite dans chaque particule de virus. L'inverse de cette dose D_i , exprimée en nombre moyen de paires d'ions par cm^3 , est donc le volume sensible moyen d'une particule de virus.

Mais on sait que la distribution spatiale des ions produits dans l'air est très irrégulière : la majorité des ions est au voisinage immédiat de la trajectoire, et la densité linéaire des ions est fonction de l'énergie du rayonnement ou de la particule ionisants. Les électrons secondaires éjectés des atomes ionisés par

le rayonnement principal sont parfois assez énergétiques pour provoquer des ionisations secondaires, et même parcourir une trajectoire nettement distincte de la trajectoire principale (rayons δ).

Dans les éléments autres que l'air, on n'a guère de données sur la distribution spatiale des ions; aussi on la calcule, mais suivant les hypothèses adoptées, les courbes de la distribution linéaire des ions le long de la trajectoire varient dans le rapport 1 à 2. Ces valeurs ne sont d'ailleurs que des moyennes.

Dans ces conditions, le calcul des dimensions de la cible n'est plus aussi simple. Lea et coll. (147, 146, 144) ont établi une méthode de calcul du « volume associé » : ils tracent les courbes théoriques de la dose d'inactivation nécessaire en fonction du diamètre de la cible pour les diverses radiations γ ou X, ou les corpuscules α , pour des valeurs variées de l'énergie du rayonnement ou des corpuscules, en tenant compte des données connues sur la distribution spatiale des ions le long de la trajectoire. On peut ensuite, d'après la dose d'inactivation expérimentale d'un virus par un rayonnement déterminé, déduire sur la courbe correspondante le volume du virus associé à ce rayonnement. Les approximations nécessaires à la conduite des calculs expliquent que le volume sensible varie de 1 à 8, le diamètre variant de 1 à 2, pour un même virus soumis à divers rayonnements (voir tableau 2).

D'autres auteurs (37, 201) utilisent la méthode qui sert à calculer la section efficace des atomes soumis au bombardement de particules : les hélions de vitesse assez réduite ont une densité ionique le long de leur trajectoire telle que la rencontre de la trajectoire et du virus suffit à inactiver celui-ci. L'inverse de la dose d'inactivation, calculée en nombre moyen d'hélions par cm^2 , est la surface moyenne de la section efficace du virus, d'où le diamètre du cercle équivalent. Cette valeur est trop grande car les rayons δ produisent, à une certaine distance de la trajectoire des hélions, des ionisations secondaires qui sont aussi inactivantes : on déduit donc du diamètre calculé une valeur appelée diamètre du cylindre d'ionisation, qui varie de 5 à 50 $\text{m}\mu$ (50, 40) sans raison apparente; ou bien, on multiplie le diamètre calculé par un facteur de correction 0,8 (28). Cette méthode donne des résultats sensiblement identiques à ceux obtenus par le calcul du volume associé, pour les hélions peu énergétiques émis par les corps radio-actifs naturels. Mais pour

les particules très rapides, hélions ou deutons, lancées par les accélérateurs, le raisonnement semble infirmé par l'expérience : pour le virus poliomyélitique bombardé par des hélions et des deutons d'énergie non précisée, la valeur de la section efficace varie de 1 à 23 avec un coefficient de variation égal à 100 % (202) ; avec de telles fluctuations, on peut difficilement admettre que la loi d'inactivation exponentielle soit suivie ; son seul mérite est d'attribuer au virus un diamètre moyen en parfait accord avec les résultats déjà connus de la microscopie électronique, mais trois fois plus petit que celui obtenu antérieurement par Bonet-Maury et Levaditi, utilisant la même méthode avec les hélions du radon (voir tableau 2).

L'analyse des résultats expérimentaux est encore compliquée par divers phénomènes. L'inactivation peut en effet se produire indirectement par l'intermédiaire des radicaux libérés dans la suspension par les radiations ionisantes (89, 148, 250). Pour éviter cette inactivation indirecte, on expose à l'action des rayonnements du virus desséché ou lyophilisé. Mais Bachofer (12) a montré que le volume de la cible dépendait du mode de dessiccation utilisé, et qu'il variait avec la température. Il faut signaler qu'on a décrit un phénomène de réactivation des bactériophages inactivés par les rayons X ou γ (249, 254, 67).

b) *Radiations non ionisantes.*

La lumière visible ou ultraviolette ne produisent pas d'ionisations ; elles ne font qu'exciter les atomes, mais cela suffit pour inactiver les virus. La loi d'inactivation exponentielle est toujours suivie, et le quantum inactivant est le quantum énergétique de la théorie de Planck ; si x est le nombre moyen de quanta fournis par particule de virus, k est le rendement quantique, ou encore la probabilité qu'un quantum soit absorbé dans le domaine sensible et inactive la particule virulente. On ne peut en tirer aucune information sur les dimensions des particules, malgré la relation proposée par MacLaren (175) entre le rendement quantique et la masse des particules, relation trop approximative pour être utile.

Mais l'action des radiations non ionisantes montre que l'excitation des atomes ou des molécules suffit à inactiver les virus, éventualité complètement négligée dans l'étude du mode d'action des radiations ionisantes, base de la théorie de la cible. La taille ainsi déterminée est donc entachée d'une erreur systéma-

tique par excès qu'on ne peut même pas évaluer, ne connaissant pas la façon dont les radiations ionisantes pourraient exciter les atomes. Il est possible qu'elle dépende aussi des virus étudiés, l'excitation inactivante n'étant pas identique pour tous.

L'action des rayonnements sur les virus n'est donc pas d'un grand secours pour la détermination de la taille absolue des virus. Par contre, c'est une des rares méthodes permettant de distinguer dans les particules les régions auxquelles se trouve liée une des propriétés des virus, pouvoir infectieux, pouvoir antigénique, pouvoir hémagglutinant : quand on soumet un virus à des doses croissantes de rayonnement, les diverses propriétés du virus sont détruites successivement, ce qui indique une différenciation interne, ou simultanément, preuve de l'identité des structures responsables de ces propriétés.

2. — *Action des virus sur les rayonnements*

Les méthodes et les résultats établis pour la cristallographie à l'aide de la diffraction des rayons X sont utilisables pour l'étude des cristaux de virus. Elles prouvent que les cristaux résultent d'un assemblage compact de particules identiques, disposés suivant des plans équidistants orientés régulièrement dans l'espace. Les plans cristallins, leur intervalle et leur orientation peuvent être déterminés par les équations de Bragg avec une précision supérieure à 1 %. Dans les aiguilles cristallines de virus de la mosaïque du tabac, la diffraction des rayons X indique des plans équidistants de $152 \pm 0,5$ Å (23); comme l'assemblage est compact, on admet que les particules de virus sont des bâtonnets de section hexagonale, bien qu'il soit très difficile d'observer cette forme hexagonale au microscope électronique (257). Cette méthode non destructrice rend possible l'observation continue des modifications subies par le réseau cristallin de particules sous l'influence de divers facteurs (149). Seule la diffraction des rayons X était capable de déceler la structure hélicoïdale du bâtonnet de virus de la mosaïque du tabac et de préciser sa configuration (251, 88).

Aucune autre méthode n'a un tel pouvoir de résolution; elle est malheureusement d'un emploi assez limité actuellement, car seuls les virus cristallisés en sont justifiables; ses applications s'étendront lorsque la majorité des virus auront été suffisamment purifiés et concentrés pour être cristallisés.

TABLEAU II.

DIMENSIONS DES VIRUS D'APRÈS L'ACTION DES RAYONNEMENTS

<i>Virus</i>	<i>Radiations</i>	$D_i = \text{Dose } 37\%$ <i>Paires d'Ions / μ^3</i> (1)	<i>Diamètre</i> $2. \sqrt[3]{\frac{3}{4. \pi. D_i}}$	<i>Diamètre</i> <i>Volume associé</i> $m\mu$	<i>Diamètre</i> <i>Section eff.</i> $m\mu$	<i>Réf.</i>
BACTERIOPHAGES S 13	γ (Ra)	9,9.10 ⁵	12	15,5	]	] 146
	X $\left[\begin{array}{l} \lambda = 1,5 \text{ A} \\ \lambda = 0,7 \text{ A} \end{array} \right.$	1,7.10 ⁶	10	15,9		
	α (Po 4 MeV)	1,3.10 ⁶	12	18		
		6,2.10 ⁶	7	16,3		146
	γ (Ra)	3,6.10 ⁵	17	21,5	]	] 146
	X $\left[\begin{array}{l} \lambda = 1,5 \text{ A} \\ \lambda = 0,7 \text{ A} \end{array} \right.$	7,3.10 ⁵	14	22,3		
C 36	α (Po 4 MeV)	6,0.10 ⁵	15	25		270
		1,8.10 ⁶	10	33		146
	γ (Ra)	1,3.10 ⁵	24	31	]	] 146
	X $\left[\begin{array}{l} \lambda = 1,5 \text{ A} \\ \lambda = 0,7 \text{ A} \end{array} \right.$	1,9.10 ⁵	21	40		
		2,1.10 ⁵	21	40		270
		7,7.10 ⁴	29	48		171
Staphyl. K	α $\left[\begin{array}{l} \text{Po } 4 \text{ MeV} \\ \text{Ra } \left[\begin{array}{l} 4 \text{ MeV} \\ 7 \text{ MeV} \end{array} \right] \end{array} \right.$	8,6.10 ⁵	13	50	]	] 146
		1,1.10 ⁶	12	43		
		4,0.10 ⁵	17	58		
		6,7.10 ⁴	30	55	]	] 115
	X $\left[\begin{array}{l} \text{Polychromatique} \\ \lambda = 0,7 \text{ A} \end{array} \right.$	7,6.10 ⁴	29	52		
	α (Ra 7 MeV)	2,4.10 ⁵	20	32		270
C 16		3,8.10 ⁵	17	60	100 - 40	115

FIÈVRE APTEUSE	X ($\lambda = 0,9$ A) α (Ra 7 MeV)	8,8.10 ⁵ 2,6.10 ⁶	13 9	22 25	40 - 10	38 36
GRIPPE	α (7,6 MeV) Deutons (3,8 MeV) Electrons (2 MeV)	9,0.10 ⁵ 2,6.10 ⁴	13 42	38	70 50	118
HERPES	α (Ra)	6,0.10 ⁴	30	160	260 - 40	35
NEWCASTLE	X α	2,4.10 ⁴ 5,7.10 ⁵	40 15	50	99 99	269
POLIOMYELITIS	Deutons (3,7 MeV) Electrons (1 MeV) α	6,8.10 ⁴	30		27 31	28 202
VACCINE	Deutons α (Ra 7 MeV) γ (Ra) X α	4,0.10 ⁵ 1,4.10 ⁵ 1,2.10 ⁶ 1,7.10 ⁵ 4,0.10 ⁵ 6,6.10 ⁴	17 24 12 22 17 30	60 31 17 42 79 160	100	39 145 38 145 40
MOSAÏQUE du Tabac	γ (Ra) X α	6,3.10 ⁵ 2,5.10 ⁶ 7,3.10 ⁵ 3,6.10 ⁶	14 9 14 8	19 20 23 25	280 - 50	147
RABOUGRISSEMENT de la Tomate	γ (Ra) X α	7,7.10 ⁵ 5,3.10 ⁶ 1,0.10 ⁶ 4,9.10 ⁶	14 7 12 8	17,4 14,3 20,1 27,0		

(1) Les doses sont calculées d'après : 1 r. = 1,7 paire d'ions par microns³ pour les rayons X et γ .
1 r. = 1,9 paire d'ions par microns³ pour les rayons α .

TABLEAU III. — DIMENSIONS DES PRINCIPAUX VIRUS EN $m\mu$.

Virus	Filtration	Centrifugation $d_{m,2}$ $s_{2,0}^{0,0} \times 10^{13}$	Volume spécif.	$M \times 10^6$	Rayonne- ments	Microscope électronique	Remarques	Ref.
BACTÉRIOPHAGES	20 — 30	23			[22 33]		X, γ α	77 155 [146]
	8 — 12	20 32 15 — 17	45		16		γ , X, α	77 218 174 75 146 77 162 75
	50 — 75 60 — 90	60 — 70	550		[58 31]		α γ	[146]
	60 — 90	80 — 90						77 218 162 155
	30 — 80	57						
	60 — 90							
	80 — 120	103 — 115	600				Lyoph. [Tête Ou.] Air [Tête Qu.] Air — Indiv. Air — Groupe Nucl. Nucl. Air — Indiv. Air — Groupe	[260] [109] 105 190 [246] 112 184
	10 — 15 15 — 23 7 — 10	28 28 [30 37]	0,77 [0,77 0,83]					46 45 180
ADENO-VIRUS	80 — 120	103 — 115	600					
COXSACKIE	10 — 15 15 — 23 7 — 10	28 28 [30 37]	0,77 [0,77 0,83]					

FIÈVRE

APHTEUSE

8 — 12							O — A — C	92
3 — 5							A	161
7 — 16							A	131
								221
20 — 24							O — A — C	11
							Equilibre Sédiment.	159
							Air — Indiv.	36
							Nour. — α	152
							O	38
							X	30
							O — Air	44
								207
80 — 120							A — Air [Indiv. Groupe]	13
								79
								78
								90
							Air — Indiv.	140
							A] Air	230
							B]	117
							Air — Indiv.	259
							Air	118
							Lymph.	
							El.	
							De.	
							z	
							Filament Ac. osmique	248
							Sphère + Phos. Tu.	83
100 — 150								160
100 — 300								35
							z	86
							Air — Indiv.	55
							Air Indiv.	192
							Air — Indiv.	208
							Air — Indiv.	61
							Tête	80
								125
90 — 140							Sphère Long.] Air	
							Larg. ×	
							z	
							De.	269
							X	

NEWCASTLE *

Virus	Filtration	Centrifugation		Volume spécif.	$M \times 10^6$	Rayonne- ments	Microscope électronique	Remarques	Ref.
		d m μ	$s_{0,0} \times 10^{13}$						
OREILLONS *	100 — 150	114 — 143		0,91			110 — 170 [140 — 200 200 — 270	Polym. Formol.	80 255
	90 — 135						150 — 210		85
	200 — 300	125 — 165		0,77			280 — 380	Ps.	142
							400	L. I.	153
							380 — 530	L. I.	206
Groupe de la PSITTACOSE *							360 — 490	Ps.	
							370 — 480	Or.	
							330 — 485	Pn.	
							250 — 270	L. I.	
							380 — 435	Pn.	
PAPILLOME		66	280	0,88	47,1		44 70 45	Lyoph. Air	59
								Air	229
								Lyoph.	259
	10 — 15 [170							II — Titrage singe Titration souris	158
	15 — 23	25 — 32 30 24	160 163 100	0,75		100	α — II		39 167 184
POLIOMYÉLITE							12 — 34		204
									16
							28 31 27		224
							30	Indiv. Groupe	
	13 — 20 13 — 20 [12 — 18						27 27 41 27	Air Groupe	212
VACCINE * VARIOLE *									217
	125 — 175							II — Groupe	202
	200							II — α	
		210 — 230 170 — 180		0,91 0,85 [0,86 0,80				II — De. II — El.	28 76 25 78
		236	4910						199
						230		Sol. Tampon Sol. Sucre	40

	180 235 200	4910	0,77 0,86 0,80	80 42	145 150 178 38 62 193 151 188 189 21 193 151 186 141 149 133 57 29 222 56 23 138 235 135 215 264 139 173 178 263 149 177 259 234
VARICELLE					
MOSAÏQUE de la FÈVE	25 31	115	0,70 0,70	6,6 11,6 6,1	Solut. Sec Long. × Larg. — Lyop. X Variole Variole Cytopl. Cytopl. Air Sec Solution Diff. X — Solution Air — Groupe Air — Groupe Diff. X — Sec Diff. X — Solution Air — Individ. Diff. X — Sec — Larg.
MOSAÏQUE JAUNE du NAVET			0,69	28,6 22,8 28	24,5 22 23 26
MOSAÏQUE du TABAC *	15 — 22 13 20	174 185 185	0,73 0,73 0,73	42 63 33,2 40 34 49	138 235 135 215 264 139 173 178 263 149 177 259 234
RABOUGRISSEMENT de la TOMATE	26 13,7 29,2 37,1 13 — 20	132 146 132	0,74 0,74 0,85	7,4 8,8 10,7 18,8 9,4	264 139 173 178 263 149 177 259 234
	35,1		0,73 0,71	31,0 9,9 11,6	178 263 149 177 259 234

F. — PRINCIPAUX RÉSULTATS DE MESURE DES VIRUS

Le tableau 3 rassemble les principaux résultats des différentes méthodes de mensuration des virus. Ce tableau ne prétend pas être complet, des omissions sont inévitables; de plus, nous n'avons pas tenu compte de certains résultats qui semblent erronés d'après nos connaissances actuelles. Les travaux cités sont dans l'ensemble postérieurs à 1940, car, pour les travaux antérieurs, on trouvera un tableau complet dans l'article de Markham et coll. (178). L'astérisque désigne les virus dont les particules n'ont pas la forme sphérique.

Dans la colonne « Remarques », on indique brièvement les conditions principales de la mesure :

- Long. $\times$ larg. = longueur et largeur des particules.
- Tête — Qu. = tête et queue des particules en forme de têtards.
- Polym. — ell. = particules polymorphes ou ellipsoïdales.
- Air = préparations séchées à l'air.
- Lyoph. = préparations séchées par lyophilisation.
- Indiv. = dimensions des particules isolées.
- Groupe = dimensions des particules accolées en groupes.
- Nucl. = particules dans le noyau des cellules.
- Cyto. = particules dans le cytoplasme des cellules.
- Susp. = particules en suspension.
- Sec = particules de virus à l'état sec, déshydraté.
- γ , X, α = utilisation des rayons γ , X α .
- De. = bombardement par deutons.
- El. = bombardement par électrons.
- Diff. = diffraction des rayons X.

On a rangé sous un seul groupe les rickettsies :

- L. I. = lymphogranulomatose inguinale.
- Or. = ornithose.
- Pn. = pneumonie humaine.
- Ps. = psittacose.

Pour le virus poliomyélitique, on a précisé les types (I, II, ou III); pour le virus de la fièvre aphteuse, en plus des trois types O, A, C, il y a une souche neurotrope marquée neur.

Enfin, pour le virus de la grippe, nous avons signalé :

— Ac. osmique + Pho. Tu. = traitement des particules par l'acide osmique puis l'acide phosphotungstique.

et pour le virus des oreillons :

— Formol = fixation de particules par le formol.

Rapelons que les différences entre les résultats des différentes méthodes de mesure d'un virus tiennent en partie au principe même de la méthode et en partie aux erreurs expérimentales.

DEUXIEME PARTIE

Etude des virus de la fièvre aphteuse

La fièvre aphteuse est une maladie animale très répandue, et connue depuis longtemps; on l'a décrite dès le ^{xvi}^e siècle, et des épizooties sont signalées aux ^{xvii}^e et ^{xviii}^e siècles. L'importance économique de la maladie est énorme; la fièvre aphteuse a touché presque tous les pays du monde, et tend à prendre un caractère endémique en Europe. Dans cinq pays d'Europe, Allemagne, Belgique, Danemark, France, Italie, les pertes provoquées par la dernière épidémie de 1951-54 ont été estimées à plusieurs centaines de milliards. Cela explique que dans tous les pays on ait particulièrement étudié cette maladie, principalement dans un but curatif ou prophylactique; mais des études moins directement pratiques lui ont été aussi consacrées.

Après la démonstration de la nature filtrante de l'agent responsable de la maladie de Löffler et Frosch, en 1897, une étape importante fut franchie quand Hecker puis Waldmann et Pape montrèrent en 1920 la réceptivité du cobaye, permettant une étude expérimentale plus aisée de la fièvre aphteuse. En 1922, Vallée et Carré distinguaient deux types différents de virus, puis Waldmann un troisième peu après. En 1931, Hecke (107), Maitland et Maitland (176) réalisaient indépendamment la culture du virus *in vitro* sur tissus d'embryons de cobayes maintenus en survie, méthode appliquée par Frenkel à la production de vaccin. En 1948, M. le Professeur J. André Thomas et ses collaborateurs mettaient au point une nouvelle méthode de culture du virus sur fœtus bovin maintenu en survie par perfusion; ils réalisaient ensuite la culture du virus dans des embryomes provoquées chez la vache, obtenant ainsi de grandes quantités d'un virus de titre élevé en vue de la production de vaccin (243, 244).

Toutes ces méthodes ont pratiquement supplanté la culture du virus *in vivo*, pour l'étude des propriétés des virus aphteux.

Notre travail fut réalisé presque exclusivement à l'aide de cultures du virus en cultures de cellules épithéliales de reins de porc, car les essais de titrage de la virulence avec des cobayes nous ont montré le manque de reproductibilité des résultats, probablement dû au nombre restreint d'animaux utilisables et aux variations de leur sensibilité.

Nous avons d'abord cherché à établir les conditions optimales de culture du virus; nous avons ainsi étudié certains facteurs physico-chimiques modifiant la multiplication intracellulaire des virus aphteux; nous avons déterminé une méthode de titrage et la précision du titre obtenu.

Nous avons repris les méthodes de filtration et de sédimentation, en tenant compte des conditions particulières propres aux cultures cellulaires, pour vérifier si la sensibilité et la précision accrues des titrages influençaient les résultats.

Nous nous sommes surtout attaché à la méthode de la microscopie électronique qui, jusqu'ici, n'avait pas été exploitée dans ses possibilités multiples, aussi bien en concentrant et en purifiant des suspensions virulentes qu'en suivant le développement intracellulaire du virus.

A. — MÉTHODE DE CULTURE DU VIRUS

EN CULTURES DE CELLULES DE REINS DE PORC

Nous ne rappellerons pas toutes les méthodes de culture du virus de la fièvre aphteuse, la thèse de Salomon (213) étant très détaillée sur la question. Après les démonstrations de Hecke et de M. et H. Maitland de la multiplication des virus de la fièvre aphteuse dans les explants tissulaires, divers tissus furent essayés avec plus ou moins de succès. La méthode de digestion cellulaire adaptée par Dulbecco (66) à l'obtention de couches cellulaires continues s'est rapidement généralisée à l'étude de tous les virus, avec des modifications apportées par Youngner (272). Pour les virus de la fièvre aphteuse, on a principalement utilisé les cultures de cellules de reins de veau ou de porc, adultes ou embryonnaires (225, 15, 181, 197), et aussi d'autres tissus bovins : cœur, poumon (182), langue (52).

Notre choix s'est porté sur les reins de porcelet, car les tissus d'animaux jeunes se multiplient généralement plus vite que ceux des adultes.

1. — *Digestion et cultures de cellules de reins de porcelet*

Nous utilisons des porcelets âgés de six semaines au plus. L'animal est sacrifié le matin même au laboratoire, et l'on peut en recueillir le sang pour obtenir le sérum. Les reins sont aussitôt prélevés aseptiquement; la préparation des reins pour la digestion s'effectue sous une hotte transparente en plexiglass, stérilisée par l'eau de javel ou les U.V., dans une pièce stérile. On lave les reins dans une solution tamponnée aux phosphates, stérilisée à l'autoclave, et désignée par les initiales S. T. P. par la suite, de composition suivante :

NaCl	8 g.
KCl	0,2 g.
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	2,9 g.
KH ₂ PO ₄	0,2 g.
Eau bidistillée Q. S. P.	1.000 cm ³

Les reins sont alors décapsulés, puis découpés en petits fragments de quelques millimètres de côté; la totalité des reins à l'exception des calices est utilisée. On élimine le sang, en lavant les fragments deux ou trois fois avec du S. T. P., jusqu'à ce que le milieu reste clair. On transvase les fragments dans le récipient n° 2 (figure 1) d'un appareil à digestion continue; c'est une fiole de Kjeldhal de 250 à 300 cm³ modifiée : on a pratiqué quatre sillons assez larges et profonds sur le pourtour, et le fond est percé de trous fins, et pourvu d'un double fond muni d'une tubulure. Le récipient n° 1 est une ampoule à décanter servant de réservoir pour une solution, à 37° C., de 0,25 % de trypsine dans le S. T. P., stérilisée par filtration sur bougie Chamberland type L3. Le récipient n° 3 est un pot à centrifuger.

On pince d'abord le tuyau de caoutchouc entre les récipients n° 2 et 3 avec une pince de Mohr, et on verse dans la fiole environ 100 cm³ de la solution de trypsine. L'agitation du contenu de la fiole est assurée par un petit aimant permanent enrobé dans un cylindre de verre, et qui est actionné de l'extérieur par un champ magnétique tournant produit par un agitateur magnétique (n° 4). Après 10 à 15 minutes d'agitation, on pince le tuyau entre les récipients 1 et 2 ainsi que le tuyau de la fiole ouvert à la pression atmosphérique; on libère le tuyau entre les récipients 2 et 3; la suspension cellulaire ne doit pas s'écouler, la pression atmosphérique suffisant à équilibrer la pression hydrostatique entre

la fiole et le pot. On remplit l'ampoule de 100 à 200 cm³ de solution de trypsine, et en dévissant très légèrement la pince du tuyau entre les récipients 1 et 2, on règle le débit d'écoulement de la solution de trypsine fraîche ainsi que le débit d'évacuation de la suspension cellulaire tamisée par le fond de la fiole. On assure un renouvellement régulier et continu, goutte à goutte, de la trypsine qui libère les cellules par petits groupes en digérant les fragments tissulaires; cette suspension cellulaire tamisée est recueillie dans le pot à centrifuger, refroidi dans un mélange de glace et d'eau, pour arrêter l'action destructrice de la trypsine sur les cellules isolées. On recueille environ 400 cm³ de suspension par heure, et la digestion de deux reins dure 2 à 3 heures.

La suspension cellulaire est débarrassée de la trypsine par deux ou trois lavages avec du S. T. P.; on élimine le liquide par décantation, après avoir centrifugé à faible vitesse (600 t./m.), pendant deux à quatre minutes, la suspension. Le culot cellulaire de la dernière centrifugation est redispersé dans son propre volume de S. T. P., et centrifugé dans un tube conique de façon à obtenir un culot de concentration connue: nous avons établi les conditions expérimentales telles qu'en redispersant ce culot dans le milieu nutritif (1 %) on obtient une suspension cellulaire à 10⁶ cellules au cm³ environ; cette numération se fait au microscope optique, après libération et coloration des noyaux suivant la méthode de Sanford et coll. (214) et ne fournit qu'un ordre de grandeur suffisant pour nos expériences.

Pour les cultures cellulaires, nous partons d'une suspension dans le milieu nutritif de 500.000 à 1.000.000 cellules au cm³; cette suspension, homogénéisée par agitation avec l'aimant est distribuée dans des récipients de verre, neutre ou Pyrex, que l'on ferme hermétiquement avec des bouchons de caoutchouc: flacons et tubes cylindriques (figure 2), stérilisés à l'autoclave. On les laisse ensuite à l'étuve à 37° C., en position horizontale stationnaire, les tubes étant légèrement inclinés dans des caissettes de bois pour que le milieu n'atteigne que le premier tiers du tube.

Pendant les premières quarante-huit heures, les groupes cellulaires en suspension se déposent, adhèrent au verre et commencent à proliférer; le troisième jour, on peut déjà retourner les flacons ou les tubes pour l'examen au microscope optique sans détacher les cellules. La croissance cellulaire rayonne à partir des amas cellulaires microscopiques, se développant de façon

confluente jusqu'à ce que toute la paroi inférieure du récipient soit recouverte au bout de cinq à six jours; on n'obtient pas une couche strictement monocellulaire, car en plusieurs endroits, la paroi étant déjà recouverte, les cellules forment des étages.

Les cultures sont composées en majorité de cellules du type épithélial, au noyau ellipsoïdal à peu près au centre du cytoplasme de contour polygonal (figure 3 a). Dans les cultures assez vieilles, de plus de quinze à vingt jours, on voit des cellules du type fibroblastique, très allongées, disposées en faisceaux; si les cellules épithéliales sont détruites par le virus, les cellules fibroblastiques se multiplient très rapidement, au point de reformer un tapis cellulaire. Pour éviter ces cellules fibroblastiques, nous n'utilisons pour la multiplication du virus que des cultures jeunes de 7 à 15 jours, en n'ajoutant que peu de sérum.

Le milieu des cultures doit être renouvelé périodiquement, tous les trois à sept jours suivant la nature du milieu et la vitesse de croissance cellulaire. Si l'on part d'une suspension très riche en cellules, la multiplication cellulaire est très rapide et le milieu s'acidifie vite; si on ensemence les récipients avec une suspension à moins de 500.000 cellules au cm^3 , le tapis cellulaire n'est complet qu'au bout de 10 à 12 jours, après renouvellement du milieu une fois, inconvénient non compensé par l'augmentation des tubes ou des flacons disponibles.

2. — Milieux nutritifs pour les cultures cellulaires

a) Milieu à base de solution de Earle : il dérive directement de celui préconisé par Bourdin et coll. (43), à base de solution de Earle (71) :

NaCl	6,8	g.	(M/8,5)
KCl	0,4	g.	(M/185)
SO_4Mg , 7 H_2O	0,2	g.	(M/1.230)
NaH_2PO_4 , 2 H_2O	0,156	g.	(M/960)
Dextrose	1	g.	
CaCl_2 , 2 H_2O	0,265	g.	(M/555)
NaHCO_3	2,2	g.	(M/38,2)
Eau bidistillée Q. S. P.	1.000	cm^3	

Le milieu nutritif est complété par cinq grammes d'hydrolysate de lactalbumine. Ce milieu fraîchement préparé a un pH

de l'ordre de 7,4 — 7,6. Mais le bicarbonate se décompose en solution



et le gaz carbonique se dégageant, le pH augmente. Dans les récipients hermétiquement bouchés, le gaz se dégage jusqu'à réaliser l'équilibre entre la pression partielle du gaz au-dessus de la solution et celle du gaz dissous; le pH augmente donc d'une quantité fonction du rapport du volume de la solution au volume du récipient : plus ce rapport est petit, plus le pH est élevé; à la limite, à l'air libre, ce rapport est nul et tout le bicarbonate s'est transformé en carbonate avant que la quantité de gaz soit suffisante pour rétablir l'équilibre, et le pH est celui qu'on peut calculer pour une solution M/80 environ de carbonate, soit 8,2 — 8,3.

Les cellules de reins de porc ne se développent que dans une zone de pH allant de 6,9 à 7,6. Pour ajuster le pH dans les récipients, on peut soit ajouter du gaz carbonique en remplaçant l'air par un mélange air + CO_2 , soit fournir du gaz carbonique dissous dans la solution. Nous utilisons cette méthode en faisant barboter à saturation du gaz carbonique dans le milieu jusqu'à un pH de 6,5, mesuré au pHmètre avec l'électrode de verre et l'électrode au calomel. Si l'on utilise de la phénolsulfonephthaléine comme indicateur coloré de pH, à raison de 20 mg. pour 1.000 cm^3 de solution, on fait une erreur absolue par excès de 0,4 à 0,5 par rapport au pH mesuré au pHmètre, par suite de la présence de macro-molécules de protéines : l'indicateur ne vire au jaune qu'à un pH inférieur à 6,4 au lieu de 6,8 pour les solutions minérales. Aussi les valeurs de pH que nous donnons sont mesurées au pHmètre.

On stérilise le milieu après acidification, par filtration sur bougie Chamberland L3; cette filtration produit un dégagement de CO_2 , d'où augmentation du pH; si l'on a saturé la solution en gaz et que la dépression nécessaire à l'aspiration du milieu pour la filtration n'a pas dépassé 15 cm. de Hg, le pH ne doit pas être supérieur à 6,7 — 6,8.

Dans ces conditions, il faut distribuer dans les récipients de cultures un volume de suspension cellulaire égal à peu près au vingtième du volume intérieur total : le pH s'établit alors dans la demi-heure suivante à 7,2 — 7,3. Dans les boîtes de Roux de 1.000 cm^3 , dans les flacons de pharmacie de 200 cm^3 , dans les

petits tubes de 10 cm³ et les grands tubes ou les tubes à lamelle de 25 cm³, nous mettons respectivement 100, 20, 1 et 2 cm³ de suspension cellulaire; le pH s'établit à 7,0 — 7,1 et le développement cellulaire est très rapide. Pour augmenter le nombre des tubes, on peut ne mettre qu'un demi ou un cm³ dans les petits ou les grands tubes, le pH est alors de 7,2 — 7,4, comme dans les flacons de Kolle de 320 cm³ remplis de 20 cm³ de suspension cellulaire, et la croissance cellulaire est un peu moins rapide, le tapis étant complet au bout de six à sept jours. Si le pH de la suspension, après répartition dans les récipients, est supérieur à 7,6, les cellules ne se développent pas.

Avant la distribution, on ajoute à la suspension cellulaire du sérum de porc stérilisé par filtration, à une concentration généralement inférieure à 5 %. Ce sérum est indispensable au développement cellulaire à partir de la suspension initiale, mais on peut ensuite s'en passer lors du renouvellement du milieu.

On peut éventuellement ajouter des vitamines B, soit sous forme d'une solution synthétique (156), ou plutôt sous forme d'extrait de levure à la concentration de 0,1 % de poudre sèche. Enfin on introduit des antibiotiques : pénicilline 100 U. O. et streptomycine 0,05 mg. par cm³.

Ce milieu s'épuise et s'acidifie lors du développement cellulaire; il faut le renouveler tous les cinq à six jours, ou tous les huit jours quand il contient des vitamines. Nous avons conservé ainsi des cultures cellulaires pendant plus de trois mois par renouvellement hebdomadaire du milieu.

Le milieu à base de solution de Earle fut presque exclusivement employé; c'est celui dont il s'agit par la suite quand aucune précision n'est fournie. Mais nous avons réalisé quelques essais de cultures cellulaires avec un autre milieu.

b) Milieu à base de solution de Hanks : il diffère du précédent par la solution de base qui est une solution de Hanks et Wallace (104) :

Eau bidistillée Q. S. P.	1.000	cm ³	
NaCl	8	g.	(M/7,3)
KCl	0,4	g.	(M/185)
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,2	g.	(M/1.200)
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	0,12	g.	(M/2.500)
KH ₂ PO ₄	0,06	g.	(M/2.270)
Dextrose	1	g.	
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,185	g.	(M/795)
NaHCO ₃	0,350	g.	(M/240)

On y ajoute l'hydrolysât de lactalbumine, du sérum de porc, des vitamines B, et des antibiotiques comme précédemment.

Ce milieu a un pH de l'ordre de 7,0. Comme il contient très peu de bicarbonate, il s'alcalinise très peu à l'air libre; il n'est pas nécessaire de l'acidifier. Mais la multiplication cellulaire l'acidifie trop rapidement : au bout de deux à trois jours, le pH a diminué jusqu'à 6,7-6,8. Le renouvellement trop fréquent du milieu est un inconvénient majeur qui nous l'a fait abandonner.

3. — *Conservation des cellules*

Le volume de suspension cellulaire, après digestion, peut être trop important pour être distribué en une seule fois. Nous avons essayé de le conserver à + 4° C. pour ne le distribuer que quelques jours après. Mais un séjour d'une quinzaine d'heures au réfrigérateur suffit à ralentir considérablement le développement ultérieur des cellules à + 37° C.; au bout de 48 heures à + 4° C., on n'obtient plus de développement cellulaire.

Nous avons suivi la méthode de Melnick et coll. (183) : on conserve les cellules dans le milieu nutritif à la concentration de 4 à 5.10⁶ cellules au cm³, à + 4° C., additionné d'extrait de levure. Avant distribution, on élimine le milieu par centrifugation à faible vitesse et décantation, et on lave les cellules une ou deux fois avec du P. B. S.; on les remet en suspension dans du milieu neuf à la concentration normale, et on les distribue. Même après dix à quinze jours à + 4° C., on obtient ainsi des cultures cellulaires qui se multiplient aussi rapidement que les cultures normales, et les fibroblastes ne se développent plus. Il est indispensable de mettre de l'extrait de levure dans le milieu de conservation à + 4° C., et d'éliminer ensuite ce milieu avant distribution.

4. — *Effet cytolique des virus aphteux : passages et titrages*

Les souches de virus aphteux nous ont été aimablement fournies par M. Verge, professeur à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort; ce sont des souches adaptées aux cobayes.

Le virus du type O fut d'abord entretenu par inoculation dans le derme plantaire des pattes de cobayes; le prélèvement du 56^e passage (peau de la paroi plantaire), broyé au mortier dans

le S. T. P., et filtré sur bougie Chamberland L2, fut inoculé à quelques flacons de cultures cellulaires; le tapis fut rapidement détruit. Le milieu de ces flacons fut prélevé, filtré sur bougie L2 et dilué; il conserva ce pouvoir cytolytique qui se manifeste toujours après plus de trente passages ininterrompus, les contrôles de stérilité bactériologique en bouillon et sur milieu de Sabouraud restant négatifs. Ce pouvoir cytolique ne disparaît que si l'on met en contact auparavant, à des concentrations convenables, le milieu et du sérum antiaphteux homologue, que nous a gracieusement fourni M. Galloway, Institut de Recherches vétérinaires, Pirbright. On peut donc affirmer que c'est le virus aphteux, type O, qui provoque la lyse cellulaire et qu'il se multiplie dans les cellules; car au treizième passage, par exemple, le milieu provoque une maladie généralisée chez deux cobayes sur trois à la dilution 10^{-2} , alors que la concentration du matériel virulent initial est $10^{-40.5}$. Le titre virulent pour les cobayes du virus entretenu en cultures cellulaires a diminué nettement dès le premier passage, mais s'est maintenu ensuite à peu près constant (100).

Les deux autres types, A et C, provoquent aussi la lyse cellulaire, annihilée par les sérums anti A et anti C que M. Galloway nous a obligeamment fournis. Le type A n'a acquis le pouvoir cytolytique qu'après quelques passages.

On inocule les cultures cellulaires quand le tapis est complet, au bout de cinq à sept jours; on élimine le milieu et on ajoute un volume constant (1/10 du volume du milieu) de suspension virulente. On rajoute le complément de milieu neuf soit après avoir laissé en contact virus et cellules une demi-heure à 37° C., soit immédiatement. Au bout d'un temps variant de 10 à 48 heures à 37° C. suivant la concentration de l'inoculum, on aperçoit au microscope un nombre discret de trous dans le tapis cellulaire, bordés de cellules arrondies suggérant des grappes (figure 3 b); ces trous se multiplient et s'agrandissent jusqu'à ce que tout le tapis soit détruit. Le titre du milieu augmente, passe par un maximum quand la destruction du tapis est en voie de généralisation, mais pas encore terminée.

Les passages se font toujours en flacons; on se base sur l'aspect de la dégénérescence cellulaire pour prélever le milieu quand le titre est au voisinage du maximum. Le milieu est alors centrifugé 10 minutes à faible vitesse (2.000 t./m.), pour éliminer les débris cellulaires; le surnageant est mis en ampoules que l'on

scelle pour les conserver à + 4° ou congelées à — 25° C. jusqu'au passage suivant ou au titrage.

Les titrages se font sur tubes de cultures; on dilue le milieu virulent dans le S. T. P. pour obtenir une série de suspensions dont la concentration varie suivant une progression géométrique de raison 1/2, ou 1/3,2, ou encore 1/10; on en inocule un volume constant à 5 ou 10 tubes pour chaque dilution. On regarde les tubes chaque jour, et au bout de quatre à cinq jours on note le pourcentage définitif de tubes dont le tapis cellulaire est détruit pour chaque dilution; on peut établir ainsi la courbe expérimentale des pourcentages exprimés en probits en fonction du logarithme de la concentration : c'est la courbe de titrage.

5. — Précision du titre virulent

Nous avons constaté qu'au cours de tous nos titrages, dans des conditions variées, la courbe de titrage est une droite de pente sensiblement constante; nous avons cherché à en déterminer la pente et sa variance avec précision. A l'aide de passages différents, dont nous connaissons déjà approximativement le titre, nous avons fait des suspensions de concentrations en progression de raison 1/2, chacune d'elles servant à inoculer 10 tubes : pour chaque titrage, 60 tubes inoculés plus 10 témoins non inoculés. Trois titrages pour le virus O (6°, 14°, 25° passages) et un pour le virus C (9° pasage), avec le milieu normal à 4 % de sérum :

- | | | | | |
|--|---|----------------------------------|---|------------|
| 1) Tubes de cultures de 7 jours | } | Milieu neuf ajouté | { | Virus
O |
| 2) Tubes de cultures de 16 jours | | immédiatement
après le virus. | | |
| 1) Tubes de cultures de 7 jours | } | Virus 30 m. à 37° C. | { | |
| | | avec les cellules. | | |
| 4) Tubes de cultures de 10 jours : Virus C, milieu ajouté immédiatement après. | | | | |

Les résultats sont représentés sur la figure 4. On peut calculer les pentes des droites qui correspondent le mieux aux points par la méthode des moindres carrés, ou par la méthode équivalente proposée par Gaddum (91). On attribue à chaque valeur y du

probit un coefficient pondéral B égal à $\frac{1}{\sigma_y^2 \cdot n}$, σ_y étant l'erreur standard de y , et n le nombre de tubes inoculés par dilution;

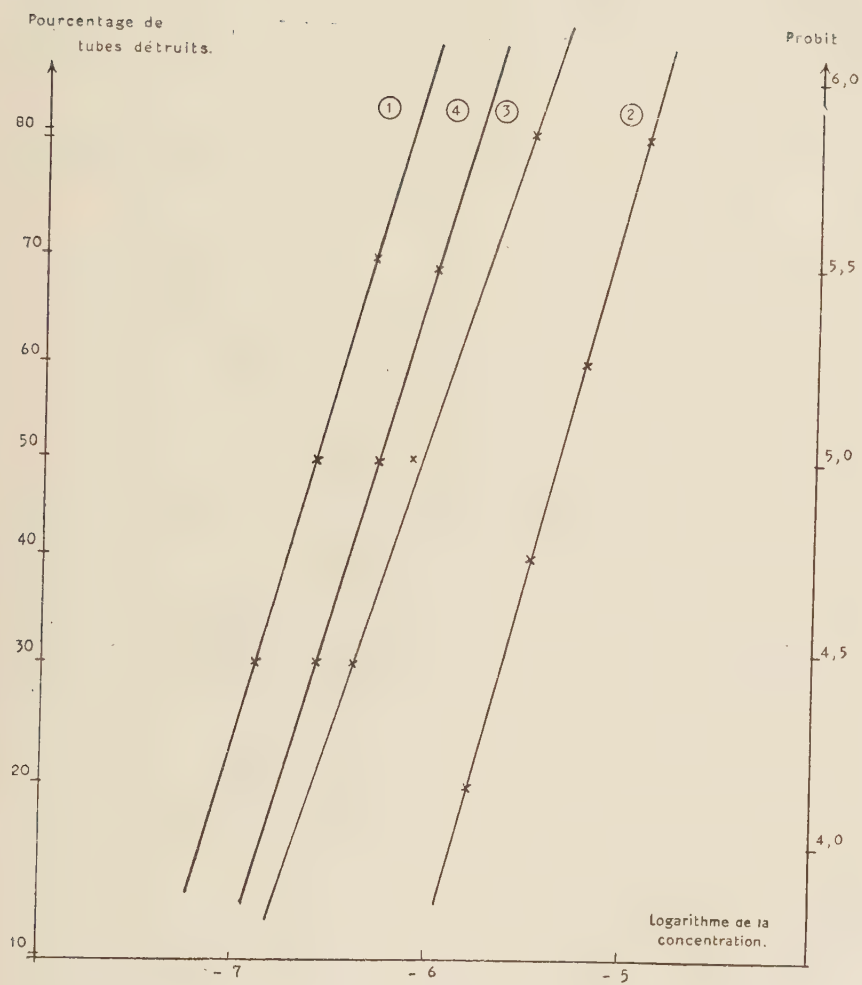


FIGURE 4

les valeurs de B sont calculées par Gaddum (91) et se trouvent dans les tables de Fisher (87). On calcule les moyennes pondérées des valeurs expérimentales des probits et des logarithmes des concentrations correspondants, y' et x' ; la pente de la droite est b ; et son écart type est σ_b :

$$x' = \frac{\sum B \cdot n \cdot x}{\sum B \cdot n} \quad b = \frac{\sum B \cdot n \cdot y \cdot (x - x')}{\sum B \cdot n \cdot (x - x')^2} \quad \frac{1}{\sigma_b^2} = \sum B \cdot n \cdot (x - x')^2$$

Pours nos expériences, on a :

1)	$b = 1,67$	$\sigma_b = 0,20$
2)	$b = 1,85$	$\sigma_b = 0,19$
3)	$b = 1,55$	$\sigma_b = 0,20$
4)	$b = 1,73$	$\sigma_b = 0,25$

Si on considère l'ensemble des quatre expériences :

$$b = 1,7 \quad \sigma_b = 0,2$$

La connaissance de la pente de la droite de titrage est utile pour le calcul de l'écart type du titre virulent; elle permet aussi de tracer la droite de titrage qui passe par le plus grand nombre de points expérimentaux, parfois réduits à deux ou même un seul, quand on inocule les suspensions de concentration en progression de raison 1/10. On interpole graphiquement le logarithme de la concentration de la suspension qui détruit les cellules dans 50 % des tubes inoculés (D. I. C. 50) et le titre est le

logarithme de $\frac{1}{\text{D. I. C. 50}}$. La variance du titre est σ^2 :

$$\sigma^2 = \frac{0,56 \, h \cdot s}{n}$$

s = inverse de la pente b .

h = logarithme de l'inverse de la raison de la progression géométrique des concentrations des suspensions.

n = nombre de tubes inoculés par dilution.

Ici $s = 0,6$ $h = 0,3$ $n = 10$
et l'écart type σ vaut $\sigma = 0,1$

Nous avons vérifié la formule de Gaddum d'après divers titrages d'un même passage, en utilisant un stock d'ampoules conservées à + 4° et à — 24° C. : les titres furent déterminés par inoculation de cinq tubes par dilution, de concentration relative

en progression de raison 1/2, toutes conditions semblables. Le tableau d'analyse de la variance se présente ainsi :

TITRES VIRULENTS	
Ampoules à + 4° C.	Ampoules à — 24° C.
6,46	6,44
6,68	6,50
6,77	6,62
6,81	6,70
	6,74
	6,78
Moyenne = 6,68	Moyenne = 6,63
Variance $\sigma^2 = 0,0245$	Variance $\sigma^2 = 0,0185$
Moyenne générale = 6,65	
Variance $\sigma = 0,0175$	
Formule de Gaddum $\sigma^2 = \frac{0,56 \cdot 0,3 \cdot 0,6}{5} = 0,0202$	

Le test de Snédécór indique que toutes ces valeurs correspondent à une seule distribution (probabilité supérieure à 95 %). La formule de Gaddum permet donc de chiffrer l'intervalle de sécurité du titre, sans procéder à plusieurs titrages, égal à $\pm 2\sigma$. La différence de deux titres a une variance égale à la somme des variances des deux titres; donc si les titrages sont faits dans les mêmes conditions (n et h identiques), il faut que deux titres diffèrent d'au moins $2 \cdot \sqrt{2} \sigma^2$, pour qu'il y ait 95,5 chances sur

Nombre de tubes par dilution n	5			10		
Raison de la progression des concentrations	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{3,2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{3,2}$	$\frac{1}{10}$
Ecart type σ	0,14	0,18	0,26	0,10	0,13	0,18
Ecart significatif d	0,40	0,51	0,72	0,28	0,36	0,51

100 que la différence ne soit pas due aux simples fluctuations statistiques : c'est ce que nous appelons l'écart significatif d entre deux titres.

$$d = 2,83 \sigma$$

On établit ainsi le tableau des valeurs de σ et d , dans les diverses conditions pratiques de titrage.

6. — Méthode des plages

La méthode, préconisée par D'Hérelle (63) pour les bactériophages, puis par Dulbecco (66) pour les virus, fut appliquée avec succès aux virus de la fièvre aphteuse par Sellers (225), Bachrach et coll. (14), Khera (124). Le tapis cellulaire est détruit en un certain nombre discret de halos ou plages par une suspension virulente; après quelques jours d'incubation à 37° C., le nombre de plages n'augmente plus, et il est fonction linéaire de la concentration relative de la suspension virulente. Nous avons déjà montré (page 9) que les raisonnements statistiques de Dulbecco et Vogt (68), Luria (170), Parker (195) étaient erronés, et qu'on pouvait seulement affirmer que chaque plage provenait *d'au moins une unité infectieuse ou particule*, certaines provenant de plusieurs particules sans qu'on puisse savoir lesquelles. Mais tous les essais de titrage par cette méthode démontrent que le nombre des plages est soumis à des fluctuations importantes, variant de 1 à 2 ou plus pour une même concentration. Bachrach et coll. (14) ont fourni tous les chiffres d'une expérience de titrage très intéressante : inoculant la même concentration virulente à 50 boîtes de cultures cellulaires, ils ont établi la courbe expérimentale de répartition du nombre des plages sur les boîtes, variant de 0 à 9, avec une moyenne de 3,68 et un écart type de 2,01. En appliquant le critère de concordance du χ^2 , ils trouvent qu'il y a près de 70 chances sur 100 pour que cette distribution coïncide avec une distribution de Poisson des unités infectieuses, en supposant que le nombre de celles-ci est égal au nombre des plages (voir tableau 4 et figure 5). Mais nous avons calculé la distribution du nombre des plages, en supposant une variation normale de Gauss de moyenne 3,68 et d'écart-type 2,01 : le test du χ^2 indique qu'il y a plus de 80 chances sur 100 que ces deux distributions soient identiques (tableau 4); ceci confirme l'indication qualitative de la figure 5 : il est plus probable que cette variation du nombre des plages provienne d'une variation aléatoire normale des facteurs contribuant au titrage, plutôt que d'une distribution de Poisson des unités infectieuses, chaque unité formant une plage.

Nombre de boîtes.

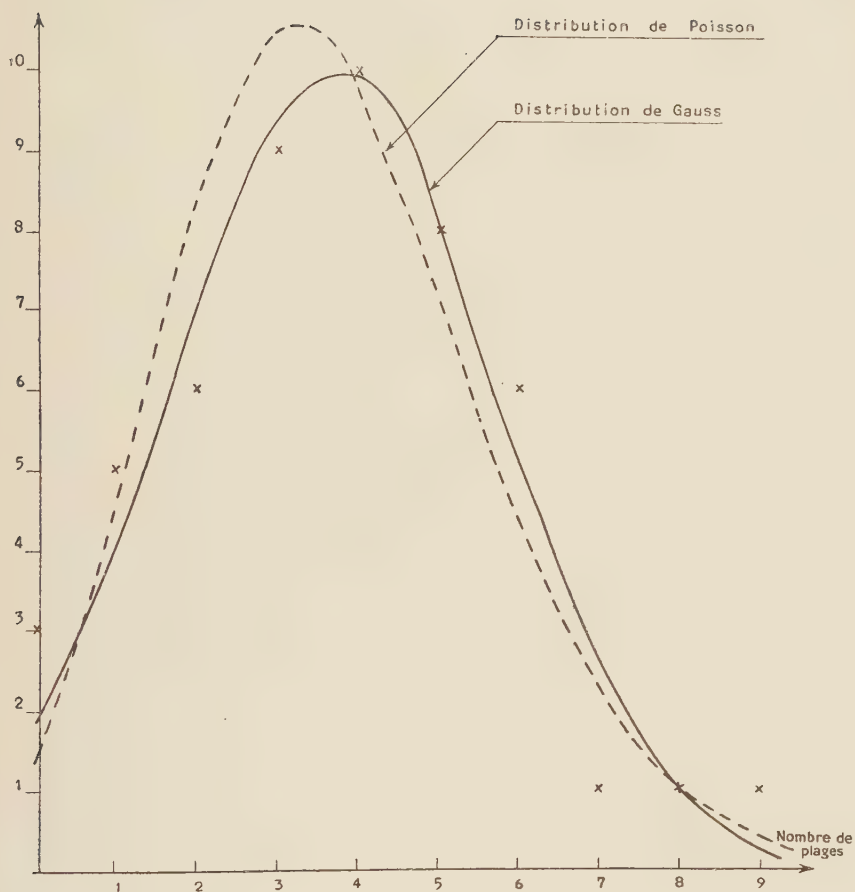


FIGURE 5

**TABEAU IV. — DISTRIBUTION DU NOMBRE DES PLAGES
DANS LES BOITES DE CULTURES CELLULAIRES
D'APRÈS LES VALEURS EXPÉRIMENTALES DE BACHRACH & Col.**

Nombre de Plages X	Nombre de Boîtes Y	Loi de Gauss		Loi de Poisson	
		$Y_1 = \frac{N}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(X-m)^2}{2\sigma^2}}$	$\chi^2 = \frac{(Y_1 - Y)^2}{Y_1}$	$Y_2 = N \cdot e^{-m} \cdot \frac{m^x}{X!}$	$\chi^2 = \frac{(Y_2 - Y)^2}{Y_2}$
0	3	1,9	0,635	1,3	2,22
1	5	4,1	0,197	4,6	0,035
2	6	7,1	0,171	8,5	0,735
3	9	9,4	0,017	10,5	0,214
4	10	9,9	0,001	9,7	0,009
5	8	8,1	0,001	7,1	0,114
6	6	5,2	0,123	4,4	0,591
7	1	2,6	0,985	2,3	0,735
8	1	1,0	0,000	1,0	0,000
9	1	0,3	1,635	0,4	0,900
184	50	49,6	3,765	49,8	5,553
Moyenne = m = 3,68 Variance $\sigma^2 = 4,06$		Degrés de liberté = 7 Probabilité = 0,80		Degrés de liberté = 8 Probabilité = 0,70	

Cette autre démonstration de l'hypothèse que chaque unité infectieuse produit une plage n'est pas plus concluante que les précédentes. Cette expérience met en évidence le fait que les fluctuations statistiques du nombre des plages sont très importantes, le

100 σ

coefficient de variation ——— étant ici de 55 %. Pour d'autres
 m

expériences, les auteurs trouvent que ce coefficient de variation est de 8 à 15 %, si l'on utilise environ 20 boîtes pour établir la moyenne se situant de 47 à 66. Or, si on titre la virulence par détermination de la D. I. C. 50, avec 5 tubes par dilution, de concentration en progression de raison 1/10, on a $\sigma = 0,26$, d'où, pour un titre de l'ordre de 6, un coefficient de variation inférieur à 5 %; et il suffit d'inoculer 4 à 5 dilutions successives, soit 25 tubes nécessaires au maximum.

Le titrage à l'aide de tubes est donc aussi précis que le titrage par numération des plages, contrairement à ce qu'écrivent de nombreux auteurs sans justification. Il est beaucoup plus facile à réaliser, nécessite moins de cellules, moins de milieu, et moins de travail : avec le même volume de suspension cellulaire, on peut obtenir 10 à 20 fois plus de tubes que de boîtes ou flacons d'où possibilité de faire de plus nombreux titrages. Il n'est pas nécessaire que le tapis cellulaire soit continu dans les tubes servant aux titrages, ce qui est indispensable dans les flacons servant à compter les plages sous peine d'une erreur systématique importante, d'où un déchet de flacons, atteignant parfois 50 %, inutilisables pour les titrages. Dans cette dernière méthode, il faut en plus préparer le milieu nutritif solide.

Ceci nous a conduit à préférer le titrage par détermination de la D. I. C. 50 au titrage par numération des plages, la précision statistique étant du même ordre, à nombre égal de réceptifs, tubes ou boîtes, mais la simplicité et la commodité des manipulations étant très nettement en faveur de la première méthode.

B. — MULTIPLICATION ET CONSERVATION DES VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

Indépendamment des fluctuations statistiques, la quantité de virus obtenue à partir d'inoculations aux cultures cellulaires dépend de divers facteurs physico-chimiques; il faut déterminer

leur influence pour ne pas risquer des variations systématiques du titre, en modifiant volontairement ou non l'un d'entre eux. Nous avons étudié quelques facteurs, dont la constance n'est pas assurée, comme l'âge des cultures cellulaires, ou dont l'influence est déjà signalée avec des résultats parfois contradictoires.

1. — *Influence de l'âge des cultures cellulaires*

L'âge et le nombre des cellules dans les tubes ne sont pas constants au cours des divers titrages; nous avons utilisé des tubes de quatre jours dans lesquels la multiplication cellulaire est très rapide et le tapis incomplet, de six jours, de quinze et vingt jours après un ou deux renouvellements du milieu, pour des titrages simultanés, toutes autres conditions identiques. Dans aucun cas, on ne trouve de différence significative entre les courbes de titrage, ni entre les délais d'apparition des destructions cellulaires (100). Ceci permet d'utiliser les tubes au fur et à mesure des besoins. La conservation des cellules à + 4° C. avant la mise en culture ne modifie pas non plus le titre.

2. — *Influence des conditions d'inoculation*

On recommande généralement de laisser la suspension virulente en contact avec les cellules à 37° C., après élimination du milieu, avant d'en rajouter du neuf, pour permettre la fixation du virus sur les cellules. Nous avons laissé la suspension virulente en contact avec les cellules à l'étuve de 0 à 45 minutes avant de rajouter le milieu neuf. Dans aucun cas, la courbe de titrage n'est modifiée (100); la seule différence réside dans le délai d'apparition de la destruction cellulaire, plus court lorsque le virus n'est dilué par le milieu qu'après 20 à 30 minutes de contact avec les cellules, et elle n'est sensible que pour les concentrations de virus les plus faibles. Comme le titre final est le même, nous avons par la suite supprimé ce temps de contact qui nécessite des manipulations supplémentaires des tubes et augmente les risques de contamination accidentelle.

On commet une erreur assez importante sur le volume de suspension virulente introduite dans les tubes. Aussi nous avons essayé, avec des tubes du même lot, d'inoculer exactement 0,1 ou 0,2 ou 0,5 cm³ de chaque dilution, en complétant immédiatement avec 0,9, 0,8 ou 0,5 cm³ de milieu neuf. Les deux premières

courbes ne diffèrent pas de façon significative (différence entre les titres = 0,1), tandis que pour la troisième il y a une translation le long de l'axe des abscisses de 0,6 unité : les titres diffèrent donc de 0,6, ce qui correspond à des concentrations dans le rapport 4, au lieu du rapport 5 des volumes inoculés.

Les variations du volume virulent inoculé ne peuvent donc produire que des variations du titre inférieures aux fluctuations statistiques; il n'est donc pas indispensable de mesurer ce volume, inférieur ou égal à 0,1 cm³, avec une précision supérieure à 30 %.

3. — *Influence du milieu nutritif*

a) *Sérum* : On a souvent signalé l'effet inhibiteur du sérum sur la multiplication du virus de la poliomyélite en cultures cellulaires. Au contraire, dans toutes nos expériences qui portent sur plusieurs lots de sérums de porcs, la présence de sérum augmente nettement l'infectivité en cultures cellulaires : lors de titrages simultanés avec des tubes du même lot d'un même passage, la courbe de titrage indique un titre supérieur lorsque les tubes ont reçu du milieu avec sérum; et lors des passages en flacons, le titre obtenu dans les flacons ayant reçu du milieu avec sérum est supérieur de 1 à 1,5 unité à celui des flacons témoins sans sérum, les titrages ayant lieu dans les mêmes conditions. Dans les deux cas, titrages ou passages, la différence des titres est encore plus grande si l'on utilise un même lot de tubes ou flacons dont le milieu a déjà été renouvelé plusieurs jours avant l'inoculation, et que la moitié du lot est déjà privée de sérum (100).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation entre le pourcentage de sérum dans le milieu et le titre : la présence de 1 % de sérum provoque une augmentation du titre parfois supérieure à celle obtenue avec du milieu à 5 % de sérum. Un essai avec du milieu à 10 % de sérum s'est montré infructueux, les cellules ayant dégénéré spontanément.

Nous avons aussi constaté que le sérum du porcelet dont les reins avaient fourni les cultures cellulaires détruisait les cultures, alors qu'il n'a aucun effet destructeur sur les cellules d'autres porcelets.

b) *Vitamines B* : La présence de vitamines B, soit sous forme synthétique, soit sous forme d'extrait de levure, augmente le titre

de 0,5 unité environ, seulement lorsqu'on cultive un même lot de cultures dont la moitié reçoit du milieu enrichi depuis la mise en cultures. L'addition de vitamines après l'inoculation n'a pas d'effet.

c) *Glutamine* : Eagle et Habel (70) la trouvent indispensable pour la multiplication du virus poliomyélitique en cultures de cellules HeLa, tandis que Pearson et coll. (196) signalent qu'elle inhibe la multiplication du virus de Theiler en cultures de cellules nerveuses de souriceaux.

Pour les virus de la fièvre aphteuse en cultures de cellules de reins de porc, l'addition de glutamine à la concentration de 100 ou 150 mg. pour 1.000 cm³ n'a aucun effet notable.

d) *pH du milieu* : Le milieu ne garde pas un pH constant pendant toute la culture : la multiplication cellulaire diminue le pH jusqu'à 6, 9-7,0 au moment où l'on renouvelle le milieu. Le pH du milieu lors de l'attaque cellulaire est environ 7,2. Si l'on utilise du milieu à base de solution de Hanks, le pH est plus petit et de l'ordre de 6,8 au moment de la lyse cellulaire.

Si l'on titre le même passage sur des tubes de cultures avec du milieu à base de solution de Hanks, le titre est inférieur de près d'une unité à celui obtenu avec du milieu à base de solution de Earle. Gifford et coll. (96) ont signalé un phénomène analogue pour le virus poliomyélitique cultivé sur cellules HeLa.

4. — *Résistance cellulaire au virus*

Nous avons observé à deux reprises une résistance de certaines cultures cellulaires au virus après une première infection. Ayant inoculé à plusieurs flacons une dose très faible de virus, certains flacons n'ont pas dégénéré. Si ces flacons reçoivent ensuite une dose massive de virus détruisant tous les témoins, ces flacons seuls résistent au virus, ainsi qu'à des inoculations répétées. Cela provient peut-être d'interférence entre virus actif et inactivé, phénomène signalé par Dinter (64). Aussi nous avons évité ensuite d'utiliser pour les titrages ou les passages des cultures ayant déjà reçu du virus et n'ayant pas dégénéré.

5. — *Conservation des virus*

Nous avons suivi les variations du titre au cours du temps d'ampoules d'un même passage, conservées à des températures

différentes : dans une chambre froide à $+ 4^{\circ}$, et à $- 24^{\circ}$ C., dans la pièce à $17-18^{\circ}$ C. Le titre ne change pas pendant 4 à 6 semaines de conservation à $+ 4^{\circ}$ C. : le tableau de la page 65 indique les résultats de titrages d'un même passage pratiqués périodiquement chaque semaine après la mise en ampoules, le titre, après 6 semaines, étant de 6,4 et après huit semaines de 6,1; le même tableau montre aussi les titres de six ampoules conservées à $- 24^{\circ}$ C. pendant un an au maximum, trois ampoules du même stock ayant donné des titres anormalement faibles (4,9, 5,4 et 3,8) sans que cela soit en relation avec la durée de conservation : nous avons constaté à plusieurs reprises cette diminution du titre d'ampoules congelées qui semble lié à la congélation et à la décongélation. En effet, les variations de température inactivent rapidement le virus : si on fait subir à une suspension virulente plusieurs cycles : réchauffement à $+ 18^{\circ}$ — refroidissement à $+ 4^{\circ}$ C., le titre diminue nettement en un jour, alors qu'à température ambiante le titre ne change pas durant quelques jours.

On a donc intérêt à conserver le milieu d'un même passage en un nombre suffisamment grand d'ampoules ou de flacons à $+ 4^{\circ}$ C. pour n'utiliser qu'une seule fois le contenu de chacun d'eux. Dans ces conditions, on est assuré de la constance du titre pendant plus d'un mois, ce qui est suffisant pour la plupart de nos expériences.

C. — MÉTHODE DE FILTRATION

Nous avons pu faire ces expériences de filtration grâce à l'obligeance de M. le docteur Grabar, chef du service de Chimie microbienne de l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu mettre à notre disposition son matériel et son laboratoire. Nous l'en remercions vivement.

Les membranes filtrantes sont confectionnées dans le service de M. Grabar, suivant une technique déjà écrite (99). Le diamètre moyen des pores (D.M.P.) est calculé par application de la loi de Poiseuille, d'après la mesure du débit de l'eau à travers les membranes, en supposant que les pores sont des cylindres rectilignes, de longueur égale à l'épaisseur de la membrane. La dispersion du diamètre des pores d'une membrane est à peu près égale au D.M.P., dont la valeur absolue n'est qu'un repère de la porosité de la membrane.

Les appareils pour la filtration comprennent deux parties en verre en forme d'entonnoir, entre lesquelles on place la membrane filtrante supportée par une plaque en verre poreux, et maintenues appliquées contre un joint de caoutchouc par des bagues métalliques et des manchons de caoutchouc (figure 6). Les diverses parties sont stérilisées séparément, soit au four, soit par ébullition dans l'eau, et montées ensemble stérilement; on adapte à l'entonnoir inférieur un erlenmeyer de 250 ou 125 cm³. On peut monter en parallèle plusieurs filtres pour augmenter le débit.

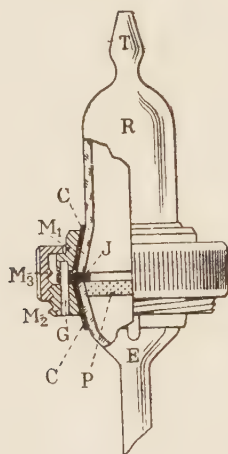


FIGURE 6

Appareil en verre pour l'ultrafiltration d'après Grabar (99)

P : Plaque en verre poreux d'Iéna qui supporte la membrane.

R : Réservoir.

E : Entonnoir muni d'une plaque.

J : Joint en caoutchouc.

C : Manchons en caoutchouc.

M₁, M₂, M₃ : Bagues métalliques de serrage.

T : Tubulure pour le remplissage.

Avant la filtration, on mouille la membrane avec quelques cm³ de milieu non virulent, et on jette le filtrat; le milieu retenu dans la membrane et la plaque de verre poreux est négligeable devant le volume de suspension virulente filtrée ensuite (100 à 200 cm³). On filtre le milieu virulent sous pression de gaz carbonique pour éviter l'augmentation spontanée du pH du milieu à l'air qui inactive le virus; la pression est constante pendant toute

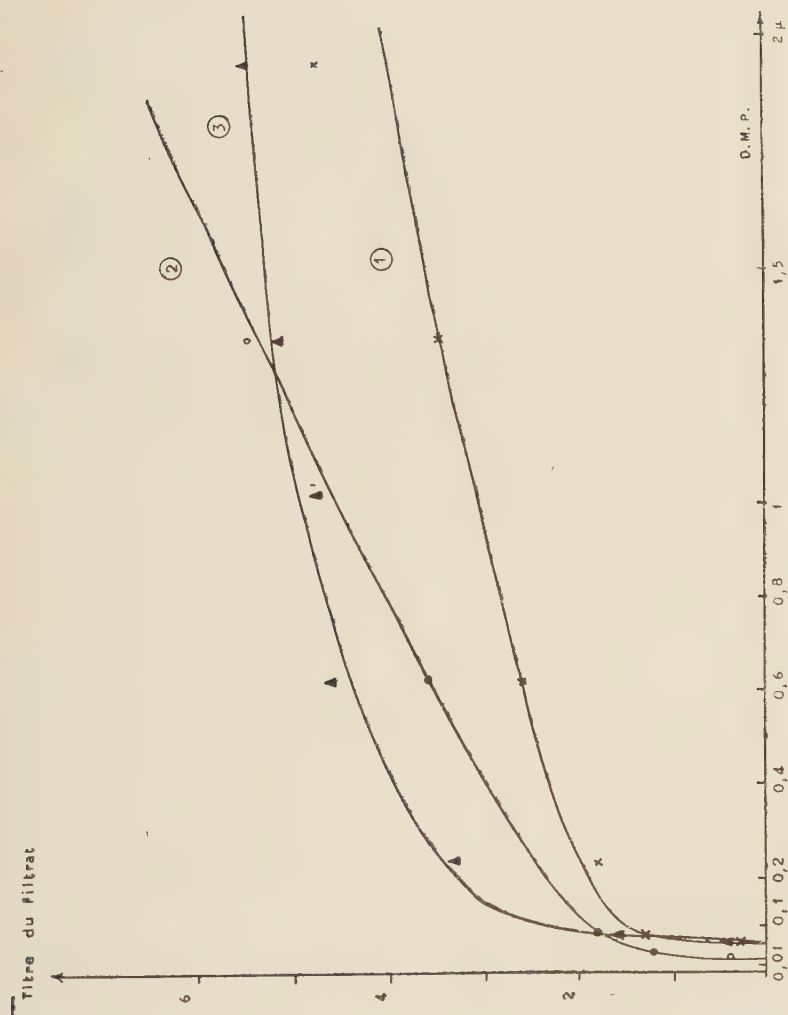


FIGURE 7

la filtration et d'autant plus faible que le D.M.P. est plus grand (99); elle est toujours inférieure à 0,8 kg./cm². On recueille le filtrat dans un erlenmeyer refroidi dans un mélange de glace et d'eau; on en prélève un cm³ pour titrer la virulence, le reste étant conservé à + 4° C. jusqu'à la filtration suivante.

Le débit diminue quand le D.M.P. diminue. On commence par filtrer la suspension sur des membranes de porosité élevée (D.M.P. environ 2 μ), le débit dépasse 1.000 cm³ à l'heure. Mais les dernières filtrations sur membranes très fines (D.M.P. inférieur à 100 m μ) ont un débit inférieur à 30 cm³ à l'heure. La détermination expérimentale complète de la courbe de filtration nécessite une dizaine de filtrations, soit plus d'une semaine pendant laquelle la suspension virulente est soumise plusieurs fois à des variations de température qui, d'après nos expériences, diminuent le titre: cela explique que nous n'ayons pu trouver de virus après filtration sur des membranes de D.M.P. inférieur à 70 m μ , le point final de filtration étant à peu près 80 m μ (figure 7-1). Car si l'on diminue rapidement le D.M.P. des membranes de façon à réduire la durée des expériences, le virus traverse des membranes de D.M.P. égal à 40,5 m μ , le point final de la filtration étant environ 30 m μ (figure 7-2). Si l'on part d'une suspension de titre plus élevé, sans réduire le nombre des filtrations, le point final ne diminue pas (figure 7-3).

Nous avons essayé de filtrer du matériel virulent provenant de broyats de peaux de la paroi plantaire de cobayes inoculés, en titrant le filtrat par inoculation aux cobayes. Mais outre la difficulté d'avoir un volume de matériel virulent supérieur à 20 cm³ de titre assez faible, environ 4, les titrages sont très imprécis et l'animal étant moins sensible que les cultures cellulaires nous n'avons pu mettre en évidence du virus dans les suspensions après filtration sur membranes de D.M.P. inférieur à 100 m μ . Les cultures cellulaires étant bien supérieures aux animaux pour l'étude des virus, nous n'avons plus utilisé que les virus entretenus en cultures cellulaires.

On voit que les résultats dépendent de la durée des expériences, sans doute par suite de l'inactivation du virus par les variations de température qu'il subit. Il est possible qu'en effectuant toutes les filtrations en chambre froide on abaisse encore le point final de filtration.

Dans les meilleures conditions, nos expériences indiquent un point final de filtration de 30 m μ environ. Suivant les formules

de correction d'Elford (73), les particules de virus auraient un diamètre de 10 à 15 m μ ; nous avons vu (page 19) que ces formules conduisent à des diamètres trop faibles et que le facteur de correction est de l'ordre de 0,7, d'où un diamètre de 21 m μ qui est en bien meilleur accord avec les valeurs trouvées par la microscopie électronique.

D. — MÉTHODE DE SÉDIMENTATION

Les expériences de centrifugation des virus de la fièvre aphteuse sont nombreuses, Randrup (207) en a établi une liste complète. Nos expériences personnelles ont été réalisées à l'aide d'une ultracentrifugeuse analytique Spinco, modèle E; elle permet l'enregistrement direct sur plaque photographique de la courbe du gradient de l'indice de réfraction en fonction de la distance à l'axe de rotation. On calcule la constante de sédimentation s , d'après le déplacement de la position du pic de cette courbe (238) :

$$s = \frac{1}{4 \pi^2 \cdot N^2} \cdot \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{2 \cdot (x_2 - x_1)}{x_1 + x_2}$$

N = nombre de tours par seconde du rotor de l'ultracentrifugeuse;

x_1, x_2 = distances à l'axe du pic aux instants t_1, t_2 .

Le calcul d'erreur nous donne :

$$\frac{ds}{s} = 2 \frac{dN}{N} + \frac{d(x_2 - x_1)}{x_2 - x_1} + \frac{d(x_2 + x_1)}{x_2 + x_1} + \frac{d(t_2 - t_1)}{t_2 - t_1}$$

Le déplacement du pic est mesuré sur les plaques agrandies 10 fois : on détermine ainsi la position du pic à 1/10 mm. Le pic se déplace d'environ 3 mm. entre deux photos, la distance à l'axe est de 6 à 7 cm. : $d(x_2 - x_1) = d(x_2 + x_1) = 2 dx = 2.0,1$.

La vitesse de rotation est déterminée par construction : elle est de 21.740 tours par minute, et elle est connue à 10 tours par

seconde près environ, soit $\frac{dn}{N} = \frac{10}{362}$.

Les instants t_1 et t_2 sont connus avec une erreur égale à la moitié du temps de pose sensiblement, 10 secondes, tandis que

l'intervalle entre les photos est de 16 minutes : $d(t_2 - t_1) = 2 \cdot 5$.

$$\frac{ds}{s} = 2 \cdot \frac{10}{362} + \frac{2 \cdot 0,1}{3} + \frac{2 \cdot 0,1}{120} + \frac{2 \cdot 5}{960} + \frac{13}{100}$$

L'erreur la plus importante provient de l'erreur sur le déplacement du pic, car le déplacement est faible, 3 mm., tandis que dx reste égal à 0,1 mm. Comme on enregistre sur une même plaque quatre ou cinq photos de la position du pic, on peut théoriquement diminuer cette erreur en mesurant le déplacement entre la première et la dernière photo (12 à 15 mm.); en fait le pic s'aplatit de plus en plus et la détermination de la position du sommet est de plus en plus imprécise, l'erreur relative finale n'est pas beaucoup diminuée.

Il faut encore ramener s aux conditions normalisées de température (20° C.) et de milieu (eau pure), soit s^∞ d'après la formule de la page 24. La température est mesurée à la base du rotor par un thermocouple, avant et après la centrifugation : l'échauffement est de 1 à 2° C. après 3 à 4 heures de marche. Nous ne tenons pas compte de l'abaissement de température pendant l'accélération (253); l'erreur sur la température est inférieure à 1° C. Le volume spécifique du virus généralement admis est 0,75, d'après les expériences de Schlesinger et Galloway (221) établissant qu'il est compris entre 0,71 et 0,77; on calcule souvent les résultats pour ces deux valeurs; nous admettrons 0,75 avec une erreur de 5 %. Cette erreur entraîne une erreur de 24 % sur s^∞ , et pour le rayon des particules calculé d'après la formule de la page 24 une erreur supérieure à 30 %.

Compte tenu de l'erreur expérimentale sur s , le rayon ou le diamètre des particules est connu à 45 % près environ.

Il faut concentrer et purifier le milieu virulent pour pouvoir détecter une variation de l'indice de réfraction lors de l'ultracentrifugation. Nous avons d'abord réalisé ceci par des cycles de centrifugation alternées à faible vitesse (accélération de l'ordre de 20.000 g.), éliminant les débris et les grosses particules, puis à grande vitesse (accélération de 100.000 g.) pour sédimenter complètement le virus. Nous avons utilisé la centrifugeuse préparative Spinco, modèle L, en pratiquant deux ou trois cycles de centrifugations; à la fin du dernier cycle, le culot est repris dans le S. T. P. pour l'ultracentrifugation, ou dans une solution d'acétate d'ammonium pour l'examen au microscope électronique.

Nous réduisons ainsi le volume de suspension virulente dans un rapport supérieur à $\frac{1.000}{1}$, mais le titre infectieux n'augmente

pas dans le même rapport, par suite d'une inactivation probable du virus et d'une perte inévitable lors des manipulations. L'expérience nous a montré que la remise en suspension du culot virulent est difficile; les particules restent agglomérées en aggrégats qui sédimentent ensuite lors de la centrifugation à faible vitesse du cycle suivant; ces aggrégats ne sont visibles qu'au microscope électronique.

Nous avons ensuite essayé la précipitation par l'alcool méthylique froid, utilisé pour divers virus (203, 119) : on ajoute au milieu refroidi 20 % de méthanol froid, et au bout de 24 à 48 heures à -5° C. il se forme un précipité blanc très fin que l'on recueille après centrifugation à 2.500 t./m. une heure. Le culot est remis en suspension dans du S. T. P. Cette suspension est déprotéinisée par agitation avec du trichlorotrifluoroéthane (nom commercial du produit : Fréon 113 - formule : $\text{CF}_3\text{Cl}-\text{CCl}_2\text{F}$) préconisé par Gessler et coll. (94) : on agite à parties égales du Fréon et le milieu virulent dans un broyeur à enceinte métallique qu'on refroidit par un mélange de glace et d'eau, pendant 10 à 15 minutes; l'émulsion formée est centrifugée 10 minutes à 2.000 t./m. et on recueille le surnageant qui est la suspension aqueuse virulente. On recommence une deuxième fois cette agitation avec une nouvelle quantité de Fréon, on centrifuge l'émulsion et on prend le surnageant. Cette suspension purifiée est concentrée par une seule centrifugation à 40.000 t./m. (accélération 100.000 g.) pendant une dizaine d'heures. Le culot est repris dans quelques cm^3 de milieu tampon ou de solution d'acétate d'ammonium. La réduction du volume de la suspension

virulente est supérieure à $\frac{3.000}{1}$, le titre n'augmentant pas dans

le même rapport. L'examen au microscope électronique indique que les particules sont peu agglomérées.

Nous avons réalisé trois essais de détermination de s^{20}_w , le premier après purification par cycles de centrifugations, les deux autres après purification par le méthanol et le Fréon.

Essai	Réduction de volume	Titre	Perte en virus	$S_{20}^0 \times 10^{13}$	d (m μ)
1	1.400	8,6	60%	168	30
2	2.200	9,3	50%	131	27
3	3.500	9,1	45%	126	26

Ces valeurs ne présentent pas de différences significatives; on ne peut en tirer une loi de variation de s_{20}^0 avec la concentration, ni extrapoler pour une concentration nulle. La première est peut-être un peu trop forte, par suite des agglomérats existants. Les diamètres calculés sont supérieurs à ceux déterminés par l'ultrafiltration, ce qui n'est pas étonnant, l'ultrafiltration provoquant une erreur systématique par défaut.

E. — MÉTHODES DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Nous avons utilisé un microscope électronique Siemens, modèle Elmiskop 1. La tension d'accélération des électrons peut varier de 40 à 100 kV, elle est le plus souvent de 60 kV pour nos expériences; nous avons limité l'ouverture du faisceau à environ $5 \cdot 10^{-4}$ radian, pour réduire les aberrations sphérique et chromatique. La distorsion de l'image, en croissant ou en barillet, provient de l'aberration sphérique de la lentille projectif, et varie avec la focale de la lentille, c'est-à-dire le grossissement: elle s'annule quand le grossissement du projectif est maximal. Pour les déterminations de la taille des particules, nous avons veillé à nous placer dans ce cas, en mettant hors circuit la lentille intermédiaire pour diminuer le grossissement et augmenter le champ. Nous avons vérifié les valeurs nominales du grossissement à l'aide de particules de latex servant d'étalon (256) et que le docteur Cosslett, Cavendish Laboratory, Cambridge, nous a aimablement envoyées. L'erreur sur le grossissement, en prenant ces précautions, ne dépasse pas 4 %, et elle reste inférieure aux erreurs provenant des méthodes de préparation des objets.



FIGURE 1



FIGURE 2

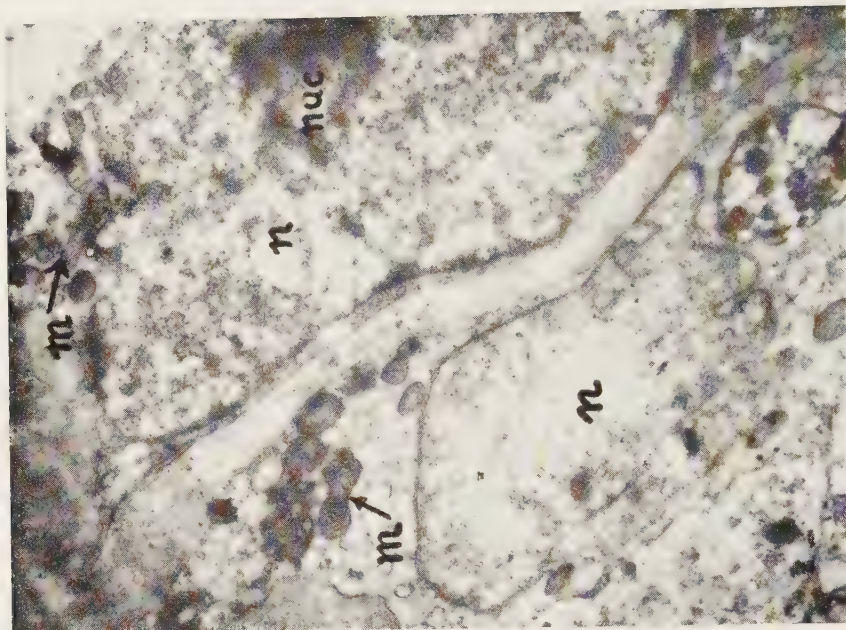
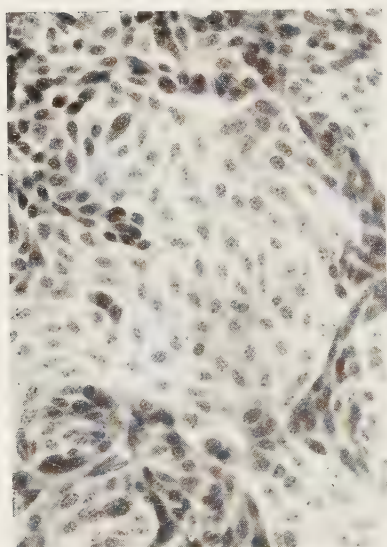
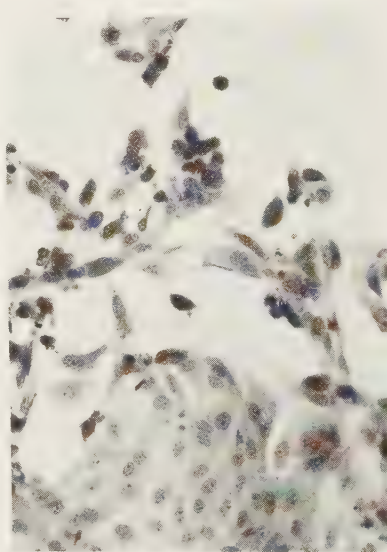


FIG. 8. — Cellules normales de cultures vieilles de 8 jours incluses dans le méthacrylate de butyle polymérisé aux U. V. — n : noyau — m : mitochondries — nuc : nucléole. Gross. 16,000 x.

FIG. 3. — Cultures de cellules épithéliales de reins de porc examinées au microscope optique après coloration à l'hémalum-éosine. — Gross. 173 x.



3 a : Cultures normales.



3 b : Cultures 24 heures après l'infection par le virus aphthéux.

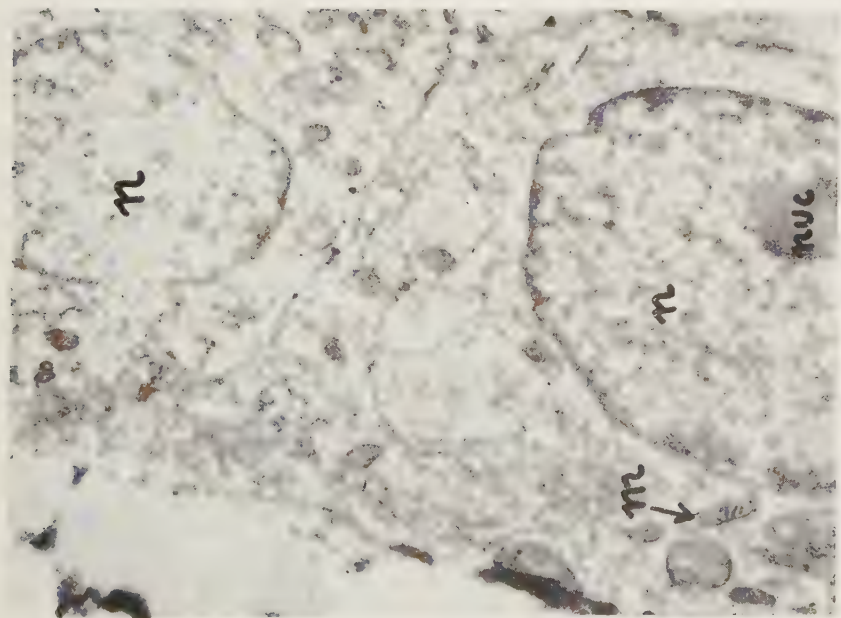


FIG. 9. — Comme la figure précédente, les cultures sont vieilles de 6 jours.

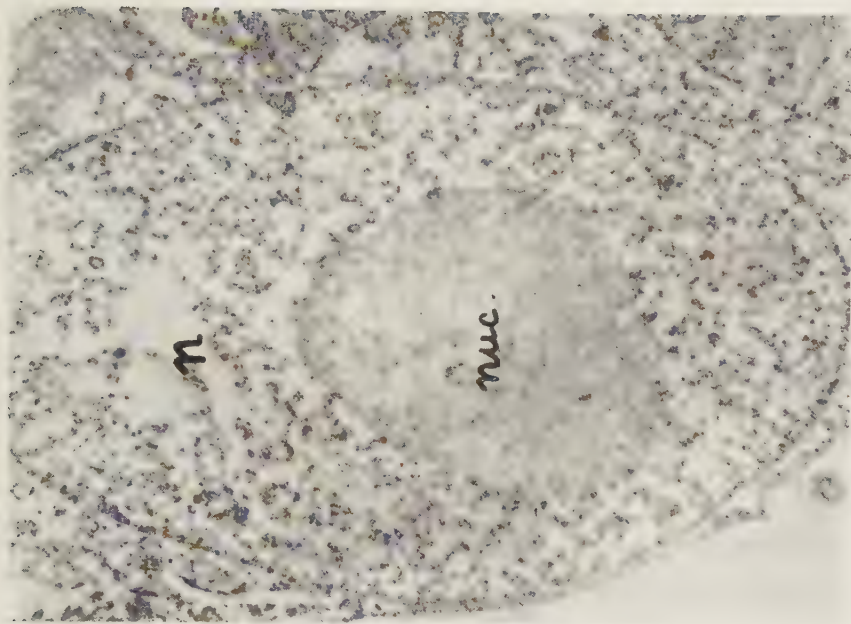


FIG. 10. — Cellule normale de cultures vieilles de 7 jours incluses dans le méthacrylate de butyle polymérisé à l'étuve à 60 C. — Gross. 10.666 x.

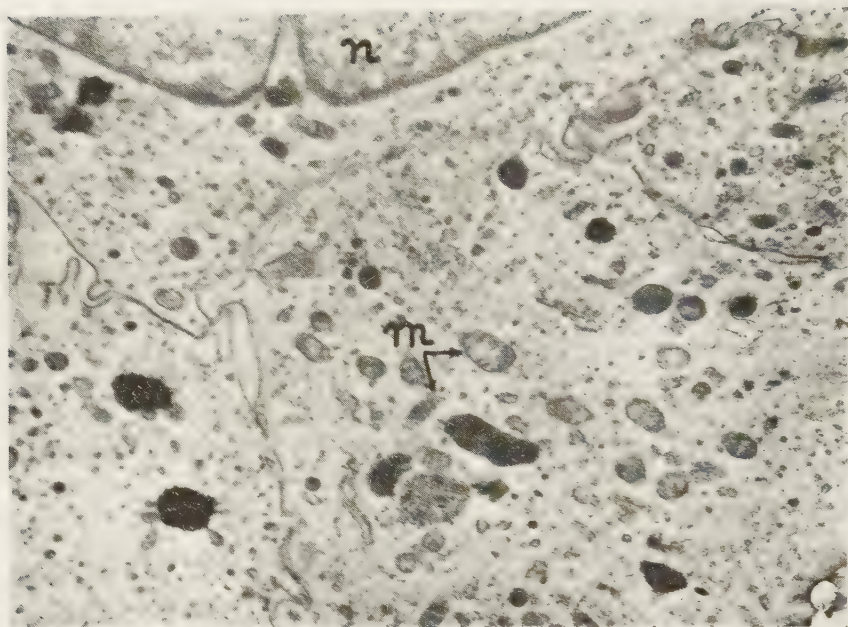


FIG. 16. Cellules normales de cellules vivantes de 8 jours, incluses dans le Winox (extérieur de 40°C). (Gross. 12420x)

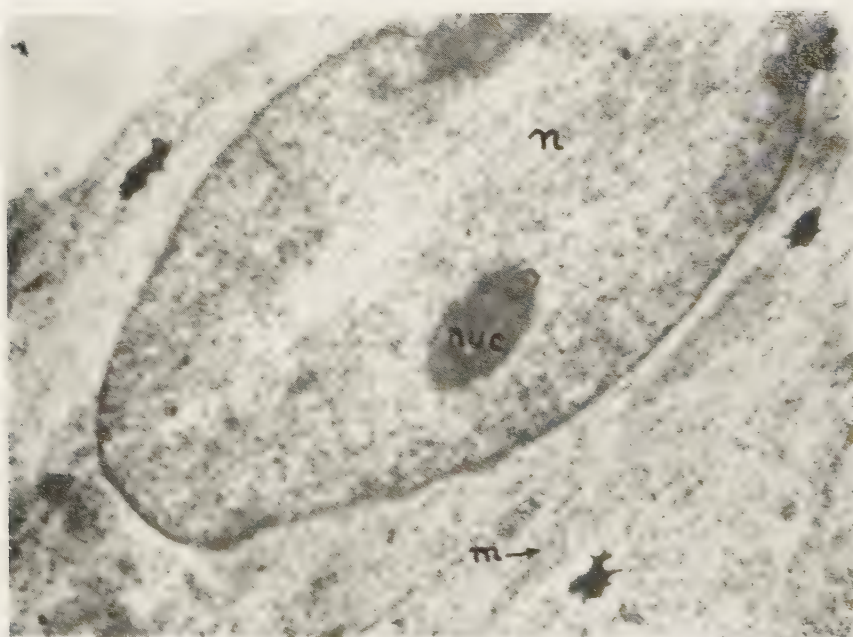


FIG. 17. Cellules normales de cellules vivantes de 8 jours, incluses dans le Winox (extérieur de 40°C). (Gross. 12420x)

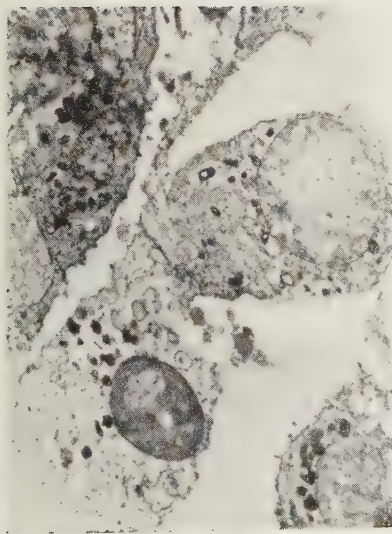


FIG. 13. — Cellule de cultures 48 heures après l'infection par le virus aphtheux de type O. Les noyaux sont arrondis et volumineux. Celui de droite représente le premier stade de l'infection. Celui de gauche est au stade suivant. — Gross. 3.250 x.

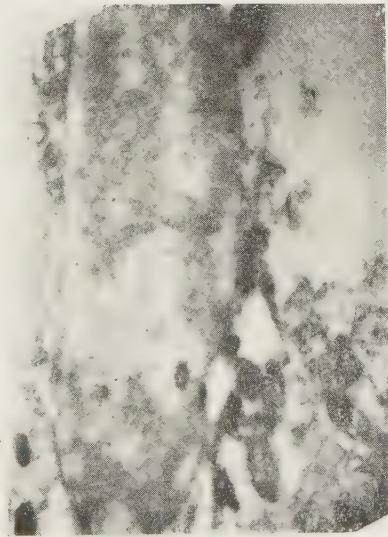


FIG. 14. — Cellule de cultures 25 heures après l'infection par le virus aphtheux. On voit la transformation du contenu nucléaire en une substance dense aux électrons qui envahit tout le noyau.

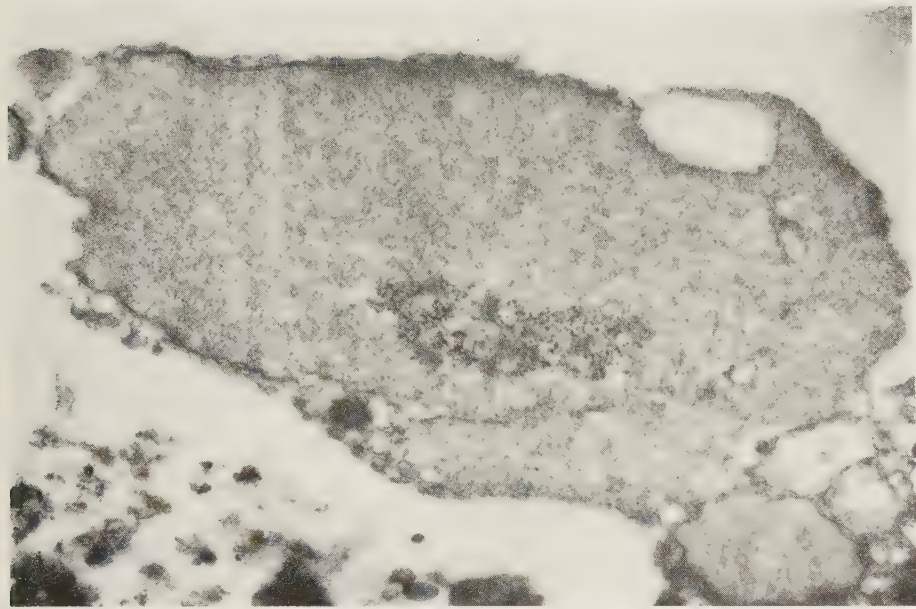


FIG. 15. — Cellule de cultures 48 heures après l'infection. A l'intérieur du noyau, apparaît une inclusion constituée de particules mal individualisées au sein d'un « viroplasma », substance plus dense aux électrons que le reste du noyau. Gross. 20.000 x.

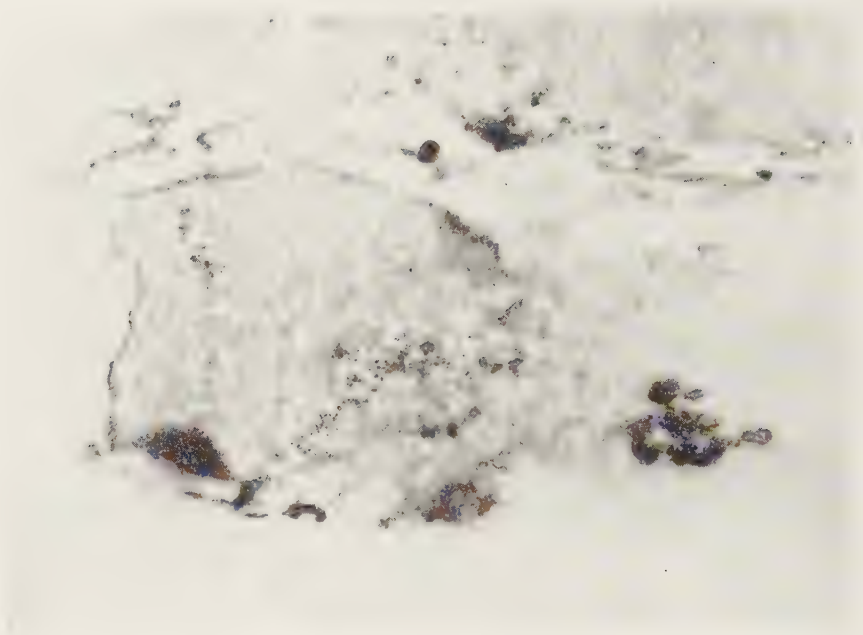


FIG. 16. — Cellule de cultures 30 heures après l'infection par le virus. La membrane nucléaire est rompue et le contenu nucléaire ponctué de particules individuelles se répand. — Gross. 20.000 x.

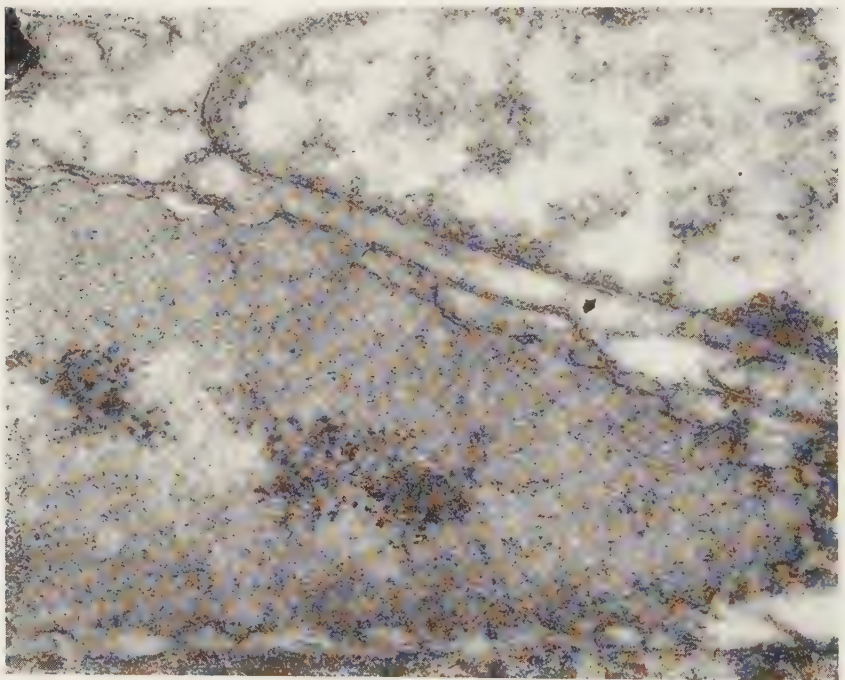


FIG. 17. — Cellules de cultures 48 heures après l'infection. En haut à droite portion de noyau normal peu homogène avec un cytoplasme abondant. En bas, noyau dans lequel on distingue deux inclusions formées de particules. Le cytoplasme est inexistant, la membrane cytoplasmique touche la membrane nucléaire. — Gross. 50.000 x.

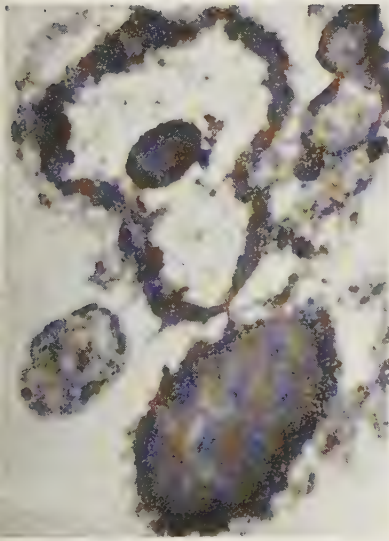


FIG. 18. — Cellule de cultures 48 heures après l'infection. Le noyau de droite semble vidé de son contenu. A côté de la grosse masse centrale en bas, on distingue quelques particules. Gross. 10,000 x.



FIG. 21. — Gouttelette de suspension de virus de la fièvre aphteuse, purifiée et concentrée par cycles de centrifugations alternées à faible et grande vitesse. La limite de la gouttelette est nettement visible renfermant un amas et quelques particules isolées, plus ou moins déformées. — Gross. 58.846 x.

Voir
FIG. 20
au verso

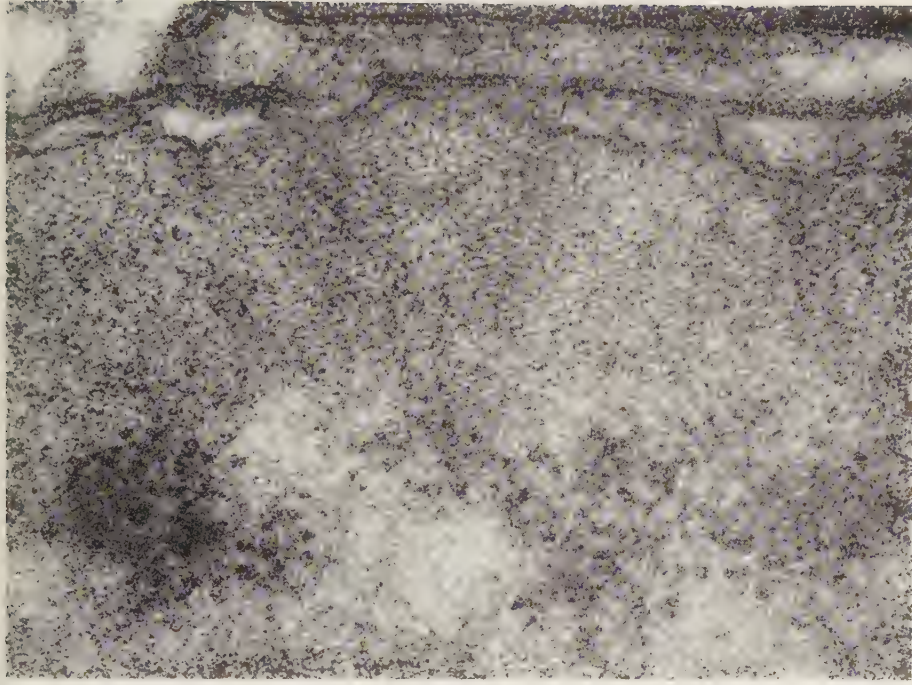


FIG. 19. — Grossissement plus élevé des inclusions du noyau de la fig. 7. — Gross. 100,000 x.



FIG. 20. — Gouttelette d'une suspension analogue à celle de la figure 21. La gouttelette contient un amas, en bas et à droite et trois particules isolées elliptiques. — Gross. $\times 1017$.

Voir FIG. 21 au recto



FIG. 22. — Portion d'une gouttelette de suspension virulente purifiée et concentrée par l'alcool méthylique et le trichlorotrifluoroéthane puis centrifugation à grande vitesse plusieurs heures. Les particules sont agglomérées en amas indissociables, quelques-unes sont détachées, mais déformées. — Gross. $\times 62.500$.



FIG. 23. — Portion d'une gouttelette de suspension virulente purifiée et concentrée par l'alcool méthylique et le trichlorotrifluoroéthane puis centrifugation à grande vitesse une heure. Les particules virulentes sont sphériques et détachées. La plus grosse particule est une particule de latex de $88 \text{ m}\mu$ de diamètre. — Gross. $\times 62.500$.

1. — *Etude du développement intracellulaire des virus*

Les cultures cellulaires sont faites en tubes à lamelle : la paroi du tube est aplatie pour permettre l'introduction d'une lamelle couvre objet sur laquelle se développent les cellules. La couche cellulaire peut être ainsi retirée du tube pour être colorée ou incluse pour les divers examens ultérieurs.

Au moment voulu, on remplace le milieu des tubes par 2 cm³ d'une solution à 1 % d'acide osinique dans un milieu préconisé par Palade (194), après les avoir lavés une ou deux fois avec du S. T. P.; la fixation par OsO₄ dure au moins une heure à + 4° C. Après lavage avec une solution tamponnée à l'acétate et au véronal, on déshydrate les cellules par passage dans des solutions d'alcool éthylique de concentration croissante puis dans l'alcool pur. Pour l'inclusion, nous avons procédé à quatre différents types d'essais :

— méthacrylate de butyle seul ou additionné de méthacrylate de méthyle, polymérisés par exposition aux U. V. d'une lampe à vapeur de mercure, avec de la benzoïne comme catalyseur (0,2 g. pour 120 cm³);

— méthacrylate de butyle polymérisé à l'étuve après addition de peroxyde de benzoyle comme catalyseur (1 %);

— mélange d'esters maléique et fumarique appelé Vinox (122) polymérisé à l'étuve à 60° C. après addition d'accélérateur (naph-ténate de cobalt) et de catalyseur (peroxyde de benzoyle);

— mélange d'esters de composition non déterminée, dit à basse réactivité, polymérisé à température ambiante après addition de catalyseur. Ce mélange nous a été fourni comme échantillon dans le laboratoire de M. Petit, chef du Service des Macromolécules, Laboratoires du C. N. R. S., Bellevue, que nous remercions.

Pour les méthacrylates, on peut, après avoir détaché les cellules de la lamelle, les introduire dans les capsules de gélatine de 1 à 2 cm³ environ, remplies du monomère liquide, que l'on polymérise ensuite. Pour les mélanges d'esters, très visqueux, il faut passer les cellules dans des solutions d'acétone et d'esters pour imprégner les cellules avant de les mettre dans le mélange de monomères purs, dans les capsules.

Après solidification par polymérisation, on taille le bloc au rasoir pour former un tronc de pyramide de section rectangulaire d'environ 1 × 2 mm. et 2 à 3 mm. de haut, à l'intérieur duquel

on aperçoit la pellicule cellulaire. On sectionne alors ce tronc de pyramide en tranches minces à l'aide d'un microtome Stiasnie : le bloc fixé à une tige métallique, qui se dilate sous l'action de l'élévation de température due à une lampe, passe devant le tranchant immobile d'un couteau de verre ou d'un diamant. Nous fabriquons les couteaux de verre en taillant des parallélogrammes dans une barre de verre de 5 à 10 mm. d'épaisseur et de 3 à 5 cm. de largeur par application de deux pointes très chaudes simultanément sur deux traits parallèles gravés sur les deux faces de la barre; cette méthode est préférable à celles généralement utilisées car les efforts internes provoquant la cassure ont à peu près la symétrie de la barre (plan de symétrie médian) : le tranchant du couteau est rectiligne et régulier. Les couteaux de verre s'ébrèchent rapidement, et il faut les remplacer. Le diamant spécialement taillé et affuté provient du laboratoire du professeur Fernandez Moran, Caracas, qui l'a gracieusement envoyé.

Par analogie avec les problèmes de polissage sur tour, nous avons modifié expérimentalement les trois principaux facteurs qui influencent le poli d'une pièce tournée : la vitesse de déplacement de la pièce, la dépouille frontale (angle compris entre la verticale et la paroi inférieure du couteau), et l'angle du couteau; la régularité des coupes et leur aspect dépendent de ces facteurs. Pour obtenir des coupes régulières, non plissées, d'épaisseur inférieure à 100 m μ , il faut, en laissant la vitesse de déplacement du bloc constante, des couteaux de verre d'angle aussi faible que possible, pratiquement 35-40°, et une dépouille frontale assez grande, 20 à 30°; avec le diamant, d'angle plus élevé, il faut réduire la dépouille frontale et surtout la vitesse de déplacement du bloc, pour que celui-ci passe devant le diamant le plus lentement possible, principalement pour les blocs durs et cassants de polyesters, que les couteaux de verre peuvent très difficilement découper.

Les coupes dès leur formation viennent flotter à la surface de l'eau d'un petit récipient dans lequel est monté le couteau; on les place directement sur des grilles recouvertes d'un film de formvar pour l'examen au microscope électronique; après séchage à l'abri des poussières 12 à 24 heures, on les examine en se limitant à des luminosités faibles (densité électronique réduite) pour diminuer la sublimation du matériau d'inclusion et les distorsions.

L'influence du matériau d'inclusion sur l'aspect cellulaire n'est

pas négligeable. Ainsi les coupes de cellules incluses dans le ou les méthacrylates polymérisés aux U. V. laissent voir un cytoplasme riche en détails fins : les mitochondries, par exemple, qui existent pratiquement sur chacune des coupes, ont une structure lamellaire; les membranes nucléaires et cytoplasmiques apparaissent souvent doubles (figures 8 et 9). Par contre la polymérisation à l'étuve du même méthacrylate contenant les mêmes cellules normales traitées identiquement donne tantôt des résultats identiques à ceux des figures 8 et 9, tantôt des résultats représentés par la figure 10 : le noyau cellulaire énorme, sans membrane, le cytoplasme informe, sans détail organisé reconnaissable; on a sur des coupes du même bloc divers aspects intermédiaires entre ces extrêmes. Ces variations aberrantes de l'aspect des cellules nous ont conduit à rejeter le procédé de polymérisation à l'étuve, qui introduit certainement des distorsions de l'objet, bien que nous ayons utilisé un catalyseur chimiquement pur.

Quant aux polyesters, les coupes de cellules montrent un aspect régulier, mais on distingue moins bien la structure fine des détails, mitochondries et membranes (figures 11 et 12); l'aspect général est moins fouillé que celui des figures 8 et 9. Cela provient peut-être du faible contraste existant entre le tissu cellulaire et le matériau d'inclusion, beaucoup plus opaque aux électrons que le méthacrylate.

L'aspect des cellules suggérant parfois un éclatement, nous avons pensé à une élévation locale de la température au cours de la polymérisation; nous avons suivi la variation de température au sein des capsules pendant la polymérisation. Nous remercions M. Petit, chef du Service de Macromolécules, Laboratoires du C. N. R. S., Bellevue, de nous avoir permis de disposer de son matériel et de son laboratoire pour ces essais. A l'aide d'un thermocouple formé de deux fils métalliques soudés à une boule de plomb minuscule, nous n'avons pas pu constater de gradient de température au sein des capsules; mais la température s'y élève, avant que le liquide se prenne en gel, d'autant plus que la température de l'étuve est plus élevée : si celle-ci est à 60°, 80° ou 100° C., la température maximale dans le monomère atteint 70°, 95° ou 140° pendant 20, 10 ou 2 minutes avant la gélification pour le Vinox ou le méthacrylate. Les monomères qui polymérisent soit sous l'action des U. V., soit à température ambiante, ne dépassent pas 25° C. Ces résultats n'expliquent donc pas les

distorsions observées aussi bien dans des blocs polymérisés à 45°, à 60° ou à 80° C.

Les mélanges d'esters ont l'inconvénient de n'avoir pas toujours la même composition; l'inclusion dans les esters est plus longue et plus délicate à réaliser que dans les méthacrylates; les coupes sont plus difficiles à obtenir et les résultats moins bons. Aussi pour suivre le développement intracellulaire des virus, nous avons inclus les cellules uniquement dans le méthacrylate de butyle qui est ensuite polymérisé aux U. V.

L'observation des cellules au microscope électronique confirme ce que l'on voit au microscope optique : la destruction cellulaire n'est jamais au même stade pour toutes les cellules d'une même culture; on trouve fréquemment dans les coupes des cellules apparemment normales adjacentes à des cellules complètement dégénérées (figure 17), ou au début de la dégénérescence. On ne peut donc espérer déterminer la chronologie de l'infection par le simple examen de coupes de cellules de cultures inoculées simultanément et fixées et incluses à des intervalles de temps réguliers. Il est préférable d'inoculer une quantité élevée de virus à plusieurs cultures et de prélever en même temps toutes les lamelles quand on constate au microscope optique que la dégénérescence est avancée : la proportion de cellules malades est plus grande et on a plus de chances au cours des coupes d'en trouver.

Chaque fois que l'on prélève des lamelles pour l'examen des cellules au microscope électronique, une lamelle identique est fixée au Bouin pour une coloration ultérieure à l'hémalum-éosine permettant de contrôler au microscope optique l'aspect de la destruction cellulaire. Nous remercions Mme Collombier, Service des Virus, Institut Pasteur de Paris, d'avoir bien voulu se charger de ces colorations.

Les altérations les plus remarquables sont du type nucléaire. Il est plus difficile de mettre en évidence celles du cytoplasme, car celui des cellules normales présente un aspect varié; mais on constate nettement une diminution et une disparition du cytoplasme vers la fin de la destruction cellulaire. L'aspect des noyaux des cellules non infectées est assez constant : entouré plus ou moins complètement d'une double membrane, le contenu est peu dense, irrégulièrement distribué, avec parfois un ou deux nucléoles beaucoup plus denses et homogènes. Ces noyaux ont fréquemment des invaginations, invisibles au microscope optique

(figure 8). Un des caractères les plus frappants des cellules infectées est la forme plus régulière, plus ramassée des noyaux qui ne présentent plus d'invaginations.

Après de nombreuses observations, nous avons pu classer les noyaux suivant quatre types principaux, qui se retrouvent dans toutes les inclusions si l'on examine un nombre suffisant de coupes. Nous avons déterminé leur fréquence relative et nous avons admis que, si les noyaux du type 1 sont plus nombreux que ceux du type 3, le type 1 représente un stade plus précoce de l'infection que le type 3 : c'est le seul moyen de préciser la succession chronologique des divers aspects de la dégénérescence. La fréquence d'apparition de chacun des types dépend du temps écoulé entre l'inoculation et la fixation des cultures, mais l'ordre des fréquences reste constant. Aussi nous indiquons les fréquences cumulées en tenant compte de toutes les observations de diverses inclusions.

Sur plus de 2.500 noyaux dénombrés dans des coupes de cultures inoculées, plus de la moitié, 57 %, avaient un aspect normal. Il est très probable que ceci provient du fait que les cellules malades n'adhèrent plus fermement à la lamelle de verre et s'en détachent au cours des bains successifs, la proportion des cellules saines se trouvant ainsi nettement augmentée.

Le premier stade de l'infection est représenté par le noyau de droite de la figure 13 : le contenu nucléaire est homogène au centre, entouré par une zone plus opaque aux électrons qui s'étend jusqu'à envahir tout le noyau, comme le montrent les noyaux de la figure 14 et le noyau de gauche de la figure 13, presque complètement opacifié, représentant le deuxième stade; on ne peut marquer de distinction nette entre ces deux stades, qui rassemblent environ 35 % des noyaux. Dans ces noyaux, on voit apparaître des inclusions, extrêmement denses aux électrons, qui semblent distinctes des nucléoles, et composées d'une substance homogène enrobant des particules : celles-ci sont de forme et de taille variables, mal individualisées, polygonales, parfois en anneau, de dimensions de l'ordre de 15 à 25 $m\mu$ (fig. 15, 16, 17, 19); le cytoplasme est presque inexistant, réduit à quelques amas épars. Sur diverses photographies, le noyau semble se rompre et le contenu nucléaire ponctué de particules denses et bien individualisées semble répandu à l'extérieur (figure 16). Ce troisième stade comprend environ 5 à 6 % des noyaux. Enfin, le dernier aspect des noyaux, le moins fréquent, 2 % des cas seule-

ment, est celui du noyau de droite de la figure 18 : le noyau semble vidé de son contenu à l'exception d'une zone marginale dense et d'une grosse masse centrale, peut-être un nucléole, au bas de laquelle on distingue quelques particules de même type que précédemment, de forme circulaire bien définie. Le noyau de gauche de cette figure paraît être au stade précédent.

Il est difficile d'affirmer que ces particules représentent le virus, car il n'est pas exclu que le virus se forme à un stade ultérieur à partir de ces particules. Leur taille est évidemment le seul argument pour conclure à l'identité des particules et du virus; si ces particules ne sont pas le virus, elles sont certainement liées à sa synthèse. On peut donc supposer que les particules de virus prennent naissance dans le noyau au sein d'un « viroplasma » et sont libérées dans le milieu par la rupture de la membrane nucléaire.

2. — *Corpuscules élémentaires de virus*

Nous avons suivi au microscope électronique les résultats des diverses méthodes de purification et de concentration utilisées pour nos essais de sédimentation.

Après la dernière centrifugation, on resuspend le culot dans une solution à 2 % d'acétate d'ammonium fraîchement préparé; nous pulvérisons la suspension sur les grilles d'observation pour le microscope, recouvertes d'un film de formvar ou de carbone, à l'aide d'une pipette Pasteur finement effilée en capillaire : les microgouttes de suspension sont reconnaissables au microscope et délimitent ainsi le champ d'observation. Lors des essais de numération, nous ajoutons à la suspension virulente, dans des proportions connues, un volume donné d'une suspension de particules de latex de $88\text{ m}\mu$ de diamètre, de concentration connue d'après le poids sec d'une partie aliquote, connaissant la densité du latex (263). Les grilles sont ombrées par projection d'un film métallique de palladium sous pression réduite (10^{-3} mm. Hg), l'angle de projection étant environ 80° , et l'épaisseur du dépôt inférieure à 10 Å (262); les particules de latex servent aussi d'étalon pour déterminer localement l'angle d'ombrage.

Lorsque la suspension virulente est concentrée par cycles de centrifugations alternées à faible et grande vitesse, on voit le plus souvent des amas dans lesquels les ombres permettent parfois de distinguer des particules individuelles; plus rarement les parti-

cules sont isolées les unes des autres, plutôt de forme ellipsoïdale. Les figures 20 et 21 montrent ainsi deux gouttelettes où l'on aperçoit sur le bord un amas qui est peut-être composé de particules telles que celles que l'on distingue, bien isolées, en petit nombre. On rencontre souvent des amas plus importants provoqués par les forces centrifuges élevées et ceci rend très imprécis les essais de numération de particules car on ne dénombre que les particules individuelles.

Si l'on procède à des purifications par l'alcool méthylique froid et le Fréon, on ne procède qu'une fois à une centrifugation à très grande vitesse en fin de concentration. La figure 22 représente un champ d'une telle suspension purifiée : la suspension est beaucoup plus riche en particules individuelles, bien qu'il existe aussi des agglomérats importants; la forme de ces particules n'est pas très régulière, cela doit provenir en partie au moins des débris, analogues à ceux visibles sur la figure, que les forces centrifuges fixent sur les particules de virus.

Si l'on ne centrifuge qu'une heure à 40.000 t./m. la suspension purifiée par le méthanol et le Fréon, il reste dans le surnageant une fraction du virus supérieure à 95 % : on ne recueille donc qu'une faible proportion des corpuscules de virus, mais les particules ne sont pas du tout agglomérées ni déformées : la figure 23 montre quelques particules de virus entourant une particule de latex de 88 $m\mu$.

Dans les seules suspensions virulentes, on trouve ainsi des particules pratiquement sphériques quand elles n'ont pas été soumises longtemps à des forces élevées (forces centrifuges) : les particules isolées mesurent 23 à 25 $m\mu$ de diamètre, celles qui sont accolées mesurent 20 à 22 $m\mu$. Les particules isolées obtenues après plusieurs cycles de centrifugations sont souvent allongées et dépassent presque toujours 25 $m\mu$ dans leur plus grande dimension. D'après la hauteur des ombres portées, on constate que le rapport de la hauteur au diamètre des particules varie de 0,8 à 1 : l'aplatissement est faible, donc le virus en suspension serait peu hydraté.

Pour établir que ces particules sont les corpuscules élémentaires de virus, nous avons mesuré la concentration d'une suspension de titre 9,1, soit $4 \cdot 10^{12}$ particules au cm^3 ; elle fut ensuite diluée au 1/5 puis au 1/10 : le titre a diminué de 0,6 et 0,8 tandis que la concentration des particules passait à $1 \cdot 10^{12}$ puis $5 \cdot 10^{11}$. Les variations du titre indiquent des variations de concen-

tration selon les rapports 1/4 et 1/6,5, tandis que celles du nombre des particules sont selon les rapports 1/4 et 1/8. Il y a donc corrélation entre le titre d'une suspension et le nombre de particules de $20 \text{ m}\mu$ qu'elle renferme : ceci prouve l'identité des particules et des corpuscules élémentaires de virus.

Nous avons aussi cherché à déterminer la masse des corpuscules élémentaires de virus (263); il faut pour cela mesurer la concentration en particules de virus ainsi que le résidu sec d'une suspension virulente. Le résultat est très approximatif, car nous ne disposons que de moins de deux cm^3 d'une suspension à environ $6 \cdot 10^{13}$ particules au cm^3 , et le poids du résidu sec de la suspension, après séchage à l'étuve à 100°C . pendant une semaine, est inférieur au milligramme; l'erreur sur ce poids est donc importante, ainsi que celle sur le volume de la suspension. De plus, on fait une erreur systématique par défaut lors de la numération des corpuscules par suite des aggrégats, la suspension étant analogue à celle dont la figure 22 représente l'aspect. Dans ces conditions, nous avons trouvé pour la masse d'un corpuscule de virus :

$$m = 6,6 \pm 1,6 \cdot 10^{-15} \text{ mg.}$$

ou pour la masse de $6,02 \cdot 10^{23}$ particules :

$$M = 4 \pm 1 \cdot 10^6 \text{ g.}$$

TROISIEME PARTIE

Discussion générale

Les virus, « ces êtres de raison », sont des organismes que l'on considère comme étant à la limite du monde vivant et du monde inanimé. Ils possèdent des propriétés de l'un et l'autre monde, et leur étude présente un intérêt théorique incontestable, car on peut penser qu'ils forment des modèles de choix permettant de démontrer le mécanisme de certaines propriétés des êtres vivants. Il est très important de savoir si morphologiquement ils se rapprochent des bactéries ou des molécules. Etant donné leur petitesse, leur invisibilité, des méthodes indirectes se sont développées pour déterminer la forme et la taille des corpuscules élémentaires des virus, après que la nature corpusculaire des virus ait été démontrée.

La propriété essentielle des virus est leur parasitisme obligatoire; comme ils ne peuvent se multiplier que dans les cellules vivantes, toute étude sur les virus se complique de la nécessité d'introduire une cause d'erreur supplémentaire, les interactions des virus et des organismes vivants dans lesquels on doit les faire se développer; on ne peut estimer la virulence d'une suspension que d'après la manifestation du pouvoir pathogène des virus pour les animaux, les plantes ou les cellules de cultures. L'ensemble de phénomènes complexes qui aboutissent à la maladie ou à la mort de l'animal ou la plante inoculés dépendent de tant de facteurs, indépendants ou non, que les résultats sont soumis à des fluctuations statistiques qui sont la cause majeure des erreurs de titrage, le coefficient de variation du titre atteignant 25 à 30 %. Cette erreur sur le titre diminue la précision de tout travail quantitatif ultérieur, mais on ne peut la réduire que par l'inoculation à un nombre prohibitif d'animaux; les méthodes de calcul précé-

nisées par divers auteurs ne sont que des palliatifs qui n'augmentent pas la précision sans augmentation correspondante du nombre d'animaux effectivement inoculés.

Aussi les cultures cellulaires ont pris une importance croissante dans l'étude des virus, car la population des récipients de cultures est homogène, abondante; un tube de culture remplace avantageusement un animal, et les fluctuations statistiques des titrages peuvent être très réduites, car l'utilisation d'un nombre élevé de tubes est réalisable : on inocule sans inconvénient un nombre de tubes 5 à 10 fois supérieur à celui des animaux et le coefficient de variation du titre ne dépasse pas 10 %.

Pour l'étude morphologique des virus de la fièvre aphteuse, nous avons donc choisi d'entretenir et de titrer les virus en cultures de cellules de reins de porc, pour lesquelles les virus de la fièvre aphteuse présentent un pouvoir cytolytique en s'y multipliant abondamment. Nous avons mesuré et calculé la précision que l'on peut atteindre d'après la valeur de l'écart type du titre; le coefficient de variation est du même ordre de grandeur, que l'on détermine le logarithme de la concentration de la suspension qui détruit les cultures dans 50 % des tubes, ou que l'on dénombre les plages provoquées sur les boîtes de cultures par un volume donné de suspension; pour cette dernière méthode, nous avons montré que les raisonnements statistiques de Dulbecco et Vogt (68) étaient inexacts et que le nombre des plages n'est ni égal ni proportionnel à celui des particules virulentes. Nous avons précisé quelques-uns des facteurs qui contribuent à modifier l'action du virus vis-à-vis des cellules et introduisent une erreur systématique dans les titrages. Ainsi le nombre des cellules et leur âge, dans certaines limites, le contact entre cellules et virus n'ont pas d'influence; l'absence de sérum de porc, et, à un degré moindre, de vitamine B dans le milieu nutritif ou la diminution de son pH diminuent, toutes choses égales d'ailleurs, le pouvoir cytolytique du virus et son titre. Nous avons donc établi les conditions de titrage, et les conditions de conservation des suspensions virulentes, permettant d'obtenir des titres reproductibles, dans les limites d'erreur calculées par la statistique.

La première méthode indirecte établie pour mesurer les virus fut la filtration sur membranes de collodion dont les pores sont assimilés à des canaux rectilignes, de section constante, et servant de tamis. Malgré les perfectionnements techniques nombreux cette méthode ne fournit qu'un ordre de grandeur relatif, entaché

d'une erreur systématique inchiffvable, car les pores forment de véritables labyrinthes, de section très inégale; des interactions électrostatiques compliquent les phénomènes, qui ne se réduisent pas à un simple tamisage. Cependant, le tableau des grandeurs relatives des virus ainsi établi s'est révélé généralement exact, et fut confirmé par les autres méthodes. Le principal mérite de la filtration est de ne provoquer aucune déformation des corpuscules élémentaires qui restent dans leur état naturel. Aux virus de la fièvre aphteuse, nos expériences attribuent une taille inférieure à 30 m μ environ, sans pouvoir préciser de limite inférieure; les résultats dépendent d'ailleurs des conditions de stabilité du pouvoir virulent avec la température et le pH du milieu; nos essais de titrage par inoculation aux cobayes donnent des valeurs nettement supérieures pour les dimensions des particules de virus, la sensibilité des animaux étant inférieure à celle des cultures.

Le recours à des champs centrifuges de plus en plus intenses n'a d'abord servi qu'à concentrer les suspensions virulentes puis la méthode est devenue quantitative grâce à l'établissement de théories de bases plus ou moins empiriques, qui calculent directement le diamètre de la sphère équivalente au virus à partir de la variation du titre dans la suspension au cours du temps. Ces mesures nécessitent évidemment l'arrêt de la centrifugation avec toutes les perturbations que cela peut entraîner. Les valeurs ainsi obtenues sont parfois entachées d'une erreur systématique, par suite d'une théorie insuffisante car trop simple, ou encore des perturbations expérimentales inévitables; mais, bien que généralement supérieures aux valeurs déterminées par la filtration, elles sont cependant plus proches des dimensions les plus probables des virus, celles fournies par la microscopie électronique ou la diffraction des rayons X. Ensuite la théorie de la sédimentation, élaborée avec un grand luxe de formules et un grand appareil mathématique pour des ultracentrifugeuses perfectionnées, n'a pas abouti à des résultats beaucoup plus précis, car les simplifications nécessaires à la poursuite des calculs ne sont que des approximations, et les courants de convection, dont on ignore l'existence, sont rien moins que négligeables. Pour les virus, la principale cause d'erreur est l'imprécision du volume spécifique, car la détermination expérimentale de celui-ci introduit à peu près certainement une modification de l'état des corpuscules en suspension, diminuant la quantité d'eau liée aux corpuscules. C'est aussi la principale critique adressée à l'ultracentrifugation de déformer

d'une manière inconnue les particules qui sont soumises à des pressions de l'ordre de 300 kg./cm^2 , et ne sont pas dans les conditions normales. Si nous ne disposions pas d'autres sources d'informations, celle-ci ne serait guère intéressante; mais comme nous avons des renseignements sur l'état des virus dans des conditions différentes, nous avons ainsi la possibilité d'étudier l'influence de certains facteurs d'environnement. Pour les virus de la fièvre aphteuse, les nombreux travaux réalisés fournissent, pour la constante de sédimentation, des valeurs s'échelonnant de 20 à $200 \cdot 10^{13}$ environ, ce qui s'explique en partie par la valeur différente adoptée pour le volume spécifique, de 0,7 à 0,8 en général. En admettant une valeur moyenne de 0,75, nos propres essais conduisent à une constante de sédimentation de 130 à $170 \cdot 10^{13}$, et à un diamètre de la sphère équivalente de 26 à $30 \text{ m}\mu$.

Le microscope électronique permet des études morphologiques plus directes, mais il déforme aussi les objets de plusieurs façons: aplatissement provoqué par la déshydratation complète, déformation due à la variation de pression osmotique pendant la préparation de l'objet pour l'examen, échauffement et sublimation de l'objet, effet de l'ombrage, distorsions de l'image provenant de l'imperfection des lentilles du microscope. Des perfectionnements techniques ont réussi à réduire ou parfois à supprimer ces déformations. Cette méthode peut aussi déterminer indirectement la masse des corpuscules de virus, dont la précision dépend principalement de la quantité pondérale de virus dont on dispose. Mais c'est surtout dans l'étude du développement intracellulaire des virus que le microscope électronique est sans équivalent; la méthode de préparation des objets introduit encore des artefacts qui ne sont pas tous connus, car l'expérience n'est pas suffisante, et on n'a pu procéder à toutes les comparaisons nécessaires; l'équivalence des colorations histochimiques reste à créer, pour aider à l'interprétation des images et à la connaissance de l'évolution chronologique de la destruction cellulaire, impossible à préciser par la seule étude qualitative des images. Les cultures cellulaires sont dans ce cas d'un grand intérêt pour leur homogénéité permettant une étude quantitative des phénomènes au microscope électronique. Nous avons pu de cette façon montrer que les cellules de cultures de reins de porc, infectées par les virus aphteux, présentent en fin de dégénérescence des inclusions intranucléaires dans lesquelles prennent naissance des particules de taille et de forme variables au début, et qui s'individualisent

et sont plus régulières lorsque, par rupture de la membrane nucléaire, elles sont répandues dans le milieu. Ce même milieu, après purification et concentration, laisse voir des particules sensiblement sphériques de 20 à 22 $m\mu$ de diamètre lorsqu'elles sont accolées, légèrement plus grandes lorsqu'elles sont isolées; si les suspensions sont concentrées par cycles répétés de centrifugations à faible et grande vitesse, les particules sont fréquemment allongées, peut-être par suite de déformations provoquées par les forces centrifuges élevées. Malgré les faibles quantités pondérales de virus dont nous disposions, nous avons pu évaluer la masse des particules élémentaires, ou encore la « masse moléculaire » à $4 \cdot 10^6$ g.

On peut calculer la masse de particules de 20 et de 22 $m\mu$ de diamètre, de densité 1/0,75; la masse de $6,02 \cdot 10^{23}$ particules est la « masse moléculaire » et vaut respectivement 3,5 et $4,5 \cdot 10^6$ g. Ceci signifie que les particules de virus de la fièvre aphteuse sont peu hydratées en suspension, car la masse déterminée par la microscopie électronique correspond à des particules déshydratées. Au contraire, la masse déterminée par Schlesinger et Galloway est plus grande : $6 \cdot 10^6$; ceci signifierait que les particules de virus contiendraient près du tiers de leur poids en eau; le faible aplatissement des particules, d'après le rapport de leur hauteur à leur diamètre, semble plutôt en faveur de la première hypothèse.

CONCLUSIONS

Les différents types de virus de la fièvre aphteuse ont fait déjà l'objet de nombreux travaux pour la détermination de leur taille par l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation. Nous avons utilisé principalement les virus entretenus en cultures cellulaires de reins de porc, ce qui nous a permis de disposer de matériel en quantité plus abondante.

1° Ces virus présentent un pouvoir cytolytique pour les cultures cellulaires à des concentrations variant suivant la composition ou le pH du milieu nutritif. Nous avons précisé les valeurs et les conditions permettant d'obtenir des résultats reproductibles. Nous avons étudié les fluctuations statistiques des titrages et calculé le coefficient de variation du titre. Les passages exclusifs en cultures cellulaires ne modifient pas leur pouvoir infectieux pour les cobayes, ni leur pouvoir antigénique

vis-à-vis des sérums immunisants contre les virus entretenus chez l'animal.

2° Il n'y a aucune différence morphologique notable entre les trois types de virus; la filtration ne peut qu'établir une limite supérieure de la taille d'environ 30 $m\mu$, tandis que la centrifugation attribue aux particules un diamètre de l'ordre de 30 $m\mu$, en admettant un volume spécifique de 0,75.

3° Le microscope électronique permet de distinguer dans les suspensions virulentes purifiées et concentrées des particules sensiblement sphériques lorsqu'elles ne sont pas soumises trop longtemps à des accélérations centrifuges élevées, et de diamètre 20-22 $m\mu$. Nous avons établi une corrélation entre la concentration numérique de ces particules et le titre, établissant ainsi pour la première fois que les corpuscules élémentaires responsables de l'infectivité des suspensions sont réellement ces particules. Nous avons aussi évalué la « masse moléculaire » : environ $4 \cdot 10^6$; donc l'hydratation des particules en suspension est réduite à moins que le volume spécifique soit très supérieur à 0,75.

4° Nous avons suivi grâce au microscope électronique l'évolution des cellules de cultures après l'infection, et nous avons précisé que la synthèse intracellulaire des virus se produit dans le noyau, au sein d'inclusions relativement peu volumineuses; celles-ci se fragmentent ensuite en particules de forme sphérique, de 20 à 25 $m\mu$ de diamètre, avant que le noyau ne soit détruit en les libérant dans le milieu.

Nous espérons avoir ainsi contribué à une meilleure connaissance des propriétés des virus de la fièvre aphteuse qui permettra peut-être de juguler cette redoutable maladie dont les conséquences économiques font un fléau.

BIBLIOGRAPHIE

1. R. A. ALBERTY. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1954, 76, 3733. — Variation of the sedimentation coefficient with time during a single velocity ultracentrifuge experiment.
2. T. F. ANDERSON. — *J. Bact.*, 1948, 55, 659. — The influence of temperature and nutrients on plaque formation by bacteriophage active on *Escherichia Coli* strain B.
3. T. F. ANDERSON. — *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1951, 13, 130. — Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope.
4. T. F. ANDERSON. — *Am. Naturalist*, 1952, 86, 91. — Stereoscopic studies of cells and viruses in the electron microscope.
5. T. F. ANDERSON. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1953, 18, 197. — The morphology and osmotic properties of bacteriophage systems.
6. T. F. ANDERSON, C. RAPPAPORT, N. MUSCATINE. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, 5. — On the structure and osmotic properties of phage particles.
7. M. L. ANSON, J. H. NORTHROP. — *J. gen. Physiol.*, 1937, 20, 575. — The calibration of diffusion membranes and the calculation of molecular volumes from diffusion coefficients.
8. H. G. ARAMBURU. — *J. comp. Path.*, 1949, 59, 42. — A comparison of different methods of inoculating guinea pigs with the virus of foot-and-mouth disease.
9. W. J. ARCHIBALD. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1942, 43, 211. — The integration of the differential equation of the ultracentrifuge.
10. W. J. ARCHIBALD. — *J. phys. coll. Chem.*, 1947, 51, 1204. — A demonstration of some new methods of determining molecular weights from the data of the ultracentrifuge.
11. M. von ARDENNE, G. PYL. — *Naturwissenschaften*, 1940, 28, 531. — Versuche zur Abbildung des Maul und Klauenseuchevirus mit dem universal Elektronen Mikroskop.
12. C. S. BACHOFER. — *Science*, 1953, 117, 280. — Direct effect of X rays on bacterial virusses, modified by physical state, in relation to the target theory.
13. H. L. BACHRACH, S. S. BREESE. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1958, 97, 659. — Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus
14. H. L. BACHRACH, J. J. CALLIS, W. R. HESS, R. E. PATTY. — *Virology*, 4, 224. — A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction.
15. H. L. BACHRACH, W. R. HESS, J. J. CALLIS. — *Science*, 1955, 122, 1269. — Foot-and-mouth disease virus: its growth and cytopathogenicity in tissue culture.
16. H. L. BACHRACH, C. E. SCHWERDT. — *J. Immunol.*, 1954, 72, 30. — Purification studies on Lansing poliomyelitis virus.
17. R. C. BACKUS, R. C. WILLIAMS. — *J. app. Phys.*, 1950, 21, 11. — The use of spraying methods and of volatile suspending media in the preparation of specimens for electron microscopy.

18. G. F. BAHR. — *Exp. Cell Res.*, 1954, 7, 457. — Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. III. Electron stains.
19. G. F. BAHR. — *Exp. Cell Res.*, 1955, 9, 277. — Continued studies about the fixation with osmium tetroxide. Electron stains IV.
20. S. L. BAKER. — *Brit. J. exp. Path.*, 1935, 16, 148. — A quantitative comparison of the effects of β rays of radium on the agent of the Rous sarcoma, on the bacteriophage, on tetanus toxin and on certain bacteria, antibodies and ferments.
21. F. B. BANG. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1949, 71, 50. — Formation of filamentous forms of Newcastle disease virus in hypertonic concentration of sodium chloride.
22. F. B. BANG. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1955, 9, 21. — Morphology of viruses.
23. F. C. BAWDEN, N. W. PIRIE, J. D. BERNAL, I. FANKUCHEN. — *Nature (Lond.)*, 1936, 138, 1051. — Liquid crystalline substances from virus infected plants.
24. H. BECHHOLD. — *Z. physik. Chem.*, 1907, 60, 257. — Kolloidstudien mit der Filtrationsmethode.
25. H. BECHHOLD, M. SCHLESINGER. — *Biochem. Z.*, 1931, 236, 386. — Die Grössenbestimmung von subvisiblen Virus durch Zentrifugieren.
26. H. BECHHOLD, M. SCHLESINGER. — *Z. Hyg. InfektKr.*, 1933, 115, 342. — Die Grössenbestimmung von Herpesvirus durch Zentrifugierungssuche.
27. B. BEHRENS. — *Arch. exp. Path. Pharmac.*, 1929, 140, 237. — Zur Auswertung der Digitalisblätter in Froschversuche.
28. M. BENYESH, E. C. POLLARD, E. M. OPTON, F. L. BLACK, W. D. BEL-LAMY, J. L. MELNICK. — *Virology*, 1958, 5, 256. — Size and structure of echo, poliomyelitis and measles viruses determined by ionizing radiation and ultrafiltration.
29. J. D. BERNAL, C. H. CARLISLE. — *Nature (Lond.)*, 1948, 162, 139. — Unit cell measurements of wet and dry crystalline turnip yellow mosaic virus.
30. R. BERNARD, H. GIRARD, J. HIRTZ, C. MACKOWIACK, R. LORRIN. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1949, 229, 1272. — Observation du virus de la fièvre aphteuse au microscope électronique.
31. M. H. BERNSTEIN. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, 2, 633. — Iron as a stain for nucleic acids in electron microscopy.
32. C. I. BLISS. — *Science*, 1934, 79, 38. — The methods of probits.
33. D. P. BLOCH, C. MORGAN, G. C. GODMAN, C. HOWE, H. M. ROSE. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1957, 3, 1. — A correlated histochemical and electron microscopic study of the intranuclear crystalline aggregates of adenovirus RI-APC virus) in HeLa cells.
34. P. BONET-MAURY. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1941, 135, 385. — Application au titrage du virus herpétique des méthodes statistiques de mesure des toxicités médicamenteuses.
35. P. BONET-MAURY. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, 68, 265. — Evaluation par irradiation α de la taille des virus.
36. P. BONET-MAURY. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, 69, 22. — Evaluation par irradiation α de la taille du virus de la fièvre aphteuse.
37. P. BONET-MAURY. — *L'irradiation des virus*. — Dans C. LEVADITI, P. LEPINE. *Les ultravirus des maladies humaines*. Librairie Maloine, 2^e édition, Paris, 1948.
38. P. BONET-MAURY, M. FRILLEY. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, 72, 432. — Action des rayons X sur le virus de la fièvre aphteuse et la vaccine.
39. P. BONET-MAURY, C. LEVADITI. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1942, 136,

481. — Evaluation par irradiation de la taille du virus de la polio-myélite (souche Lansing).
40. P. BONET-MAURY, R. PERAULT. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1941, 135, 1117. — Action du radon sur le virus vaccinal : évaluation du diamètre des corpuscules.
41. E. BORYSKO. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, 2, 3. — Recent developments in methacrylate embedding.
42. J. BOURDILLON. — *J. gen. Physiol.*, 1940, 24, 459. — A new method for the study of diffusion of biologically active material.
43. P. BOURDIN, P. ATANASIU, P. LEPINE, H. JACOTOT, A. VALLEE. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 93, 581. — Culture du virus de Teschen sur cultures épithéliales de reins de porc en couche monocellulaire.
44. C. J. BRADISH, J. B. BROOKSBY, J. F. DILLON, M. NORAMBUENA. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1952, 140, 107. — Ultracentrifugal studies of the infective and complement fixing components in the virus system of foot-and-mouth disease.
45. S. S. BREESE, A. BRIEFS. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1953, 83, 119. — Certain physical properties of a herpangina strain and a pleurodynia strain of Coxsackie virus.
46. A. BRIEFS, S. S. BREESE, J. WARREN, R. J. HUEBNER. — *J. Bact.*, 1952, 64, 237. — Physical properties of two group A Coxsackie viruses when propagated in eggs and mice as determined by ultracentrifugation and electron microscopy.
47. R. A. BROWN, D. KRITCHEVSKY, M. DAVIES. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1954, 76, 3342. — Ultracentrifugal determination of molecular weights of small molecules by the Archibald procedure.
48. W. R. BRYAN, J. W. BEARD. — *J. infect. Dis.*, 1940, 66, 245. — Correlation of frequency of positive inoculations with incubation period and concentration of purified papilloma protein.
49. W. R. BRYAN, J. W. BEARD. — *J. infect. Dis.*, 1941, 67, 5. — Host influence in the characterisation of response to the papilloma protein and to vaccinia virus.
50. N. BULGAKOV, P. BONET-MAURY. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1944, 138, 499. — Recherches sur la taille et la structure du bactériophage ϕ X 174 : action des rayons α du radon.
51. H. J. F. CAIRNS, M. EDNEY, S. F. de ST-GROTH. — *J. Immunol.*, 1952, 69, 155. — Quantitative aspects of influenza virus multiplication.
52. S. F. CARTWRIGHT, T. W. F. PAY, W. M. HENDERSON. — *J. Gen. Microbiol.*, 1957, 16, 730. — Multiplication of the virus of foot-and-mouth disease in culture.
53. J. CHARBONNIER, G. FOUCAULT. — *Bull. Micr. appl.*, 1956, 6, 189. — Sur le catalyseur de polymérisation du méthacrylate de butyle dans l'enrobage de pièces biologiques en vue de leur examen au microscope électronique.
54. E. U. CONDON, H. M. TERRILL. — *J. Cancer Res.*, 1927, 11, 324. — Quantum phenomena in the biological action of X rays.
55. L. L. CORIELL, G. RAKE, H. BLANK, T. F. MACNAIRSCOTT. — *J. Bact.*, 1950, 59, 61. — Electron microscopy of herpes simplex.
56. V. COSENTINO, K. PAIGEN, R. L. STEERE. — *Virology*, 1956, 2, 139. — Electron microscopy of turnip yellow mosaic virus and the associated abnormal protein.
57. V. E. COSSLETT, R. MARKHAM. — *Nature (Lond.)*, 1948, 161, 250. — Structure of turnip yellow mosaic virus crystals in the electron microscope.
58. H. R. COX, R. R. HYDE. — *Amer. J. Hyg.*, 1932, 16, 667. — Physical factors involved in ultrafiltration.
59. T. T. CROCKER, R. C. WILLIAMS. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1955,

- 88, 378. — Electron microscopic morphology of frozen dried particles of meningo-pneumonitis virus.
60. J. A. CROWTHER. — *Proc. roy. Soc., B.*, 1924, 96, 207. — Some considerations relative to the action of X rays on tissue cells.
61. R. CUNHA, M. L. WEIL, D. BEARD, A. R. TAYLOR, D. G. SHARP, J. W. BEARD. — *J. Immunol.*, 1947, 55, 69 — Purification and characters of the Newcastle disease virus.
62. I. M. DAWSON, A. S. MACFARLANE. — *Nature (Lond.)*, 1948, 161, 464. — Structure of an animal virus.
63. F. D'HERELLE. — *Le bactériophage. Son rôle dans l'immunité.* — Monographies de l'Institut Pasteur. Masson, Paris, 1921.
64. Z. DINTER. — *Arch. ges. Virusforsch.*, 1958, 8, 42. — Interferenz zwischen cytopathogenen und nicht-cytopathogenen Partikeln des Virus der Maul-und-Klauenseuche.
65. C. A. DRAGSTED, V. F. LANG. — *J. Pharm. exp. Therap.*, 1928, 32, 215. — Respiratory stimulants in acute cocaine poisoning in rabbits.
66. R. DULBECCO. — *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1952, 38, 747. — Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.
67. R. DULBECCO. — *Photoreactivation.* — Dans : A. HOLLAENDER. — *Radiation biology. Tome II. Ultraviolet and related radiations.* McGraw Hill Book Company, New York, 1955.
68. R. DULBECCO, M. VOGT. — *J. exp. Med.*, 1954, 99, 167. — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus.
69. K. R. DUMBELL, A. W. DOWNIE, R. C. VALENTINE. — *Virology*, 1957, 4, 467. — The ratio of the number of virus particles to infective titer of cowpox and vaccinia virus suspensions.
70. H. EAGLE, K. HABEL. — *J. exp. Med.*, 1956, 104, 271. — The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell.
71. W. R. EARLE. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1943, 4, 165. — Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.
72. W. J. ELFORD. — *J. Path. Bact.*, 1931, 34, 505. — A new series of graded collodion membranes suitable for general bacteriological use, especially in filterable virus studies.
73. W. J. ELFORD. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1933, 112, 384. — The principles of ultrafiltration as applied in biological studies.
74. W. J. ELFORD. — *Brit. J. exp. Path.*, 1936, 17, 399. — Centrifugation studies : critical examination of a new method as applied to the sedimentation of bacteria, bacteriophage and proteins.
75. W. J. ELFORD. — *The sizes of viruses and their determination.* Dans : R. DOERR, C. HALLAUER. — *Handbuch der Virusforschung.* Tome I. Wien, 1939, Verlag von Julius Springer.
76. W. J. ELFORD, C. H. ANDREWES. — *Brit. J. exp. Path.*, 1932, 13, 36. — Filtration of vaccinia virus through gradocol membranes.
77. W. J. ELFORD, C. H. ANDREWES. — *Brit. J. exp. Path.*, 1932, 13, 446. — The sizes of different bacteriophages.
78. W. J. ELFORD, C. H. ANDREWES. — *Brit. J. exp. Path.*, 1936, 17, 422. — Centrifugation studies : the viruses of vaccinia, influenza and Rous sarcoma.
79. W. J. ELFORD, C. H. ANDREWES, F. F. TANG. — *Brit. J. exp. Path.*, 1936, 17, 51. — The sizes of the viruses of human and swine influenza as determined by filtration.
80. W. J. ELFORD, C. M. CHU, I. M. DAWSON, J. A. DUDGEON, F. FULTON, J. SMILES. — *Brit. J. exp. Path.*, 1948, 29, 590. — Physical properties of Newcastle disease, fowl plague and mumps.

81. W. J. ELFORD, J. D. FERRY. — *Brit. J. exp. Path.*, 1935, 16, 1. — The calibration of graded collodion membranes.
82. W. J. ELFORD, I. A. GALLOWAY, J. R. PERDRAU. — *J. Path. Bact.*, 1935, 40, 135. — The size of the virus of poliomyelitis as determined by ultrafiltration analysis.
83. W. J. ELFORD, J. R. PERDRAU, W. SMITH. — *J. Path. Bact.*, 1933, 36, 49. — The filtration of herpes virus through graded collodion membranes.
84. E. L. ELLIS, M. DELBRUECK. — *J. gen. Physiol.*, 1939, 22, 365. — The growth of bacteriophage.
85. J. F. ENDERS. — *Mumps*. Dans : T. M. RIVERS. — *Viral and rickettsial infections of man*. 2^e édition, 1952, J. B. Lippincott, London.
86. A. S. EVANS, J. L. MELNICK. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1949, 71, 283. — Electron microscopic studies of the vesicle and spinal fluids from a case of herpes zoster.
87. R. A. FISHER, F. YATES. — *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. 4^e édition, Hafner, New York, 1953.
88. R. E. FRANKLIN, A. KLUG, K. C. HOLMES. — *X ray diffraction studies of the structure and morphology of tobacco mosaic virus*. Dans : *The nature of viruses* (Ciba Foundation Symposium), Churchill, London, 1957.
89. W. F. FRIEDEWALD, R. S. ANDERSON. — *J. exp. Med.*, 1941, 74, 463. — Influence of extraneous proteins and virus concentration on the inactivation of the rabbit papilloma virus by X rays.
90. W. F. FRIEDEWAD, E. G. PICKELS. — *J. exp. Med.*, 1944, 79, 301. — Centrifugation and ultrafiltration studies on allantoic fluid preparations of influenza virus.
91. J. H. GADDUM. — *Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun. (Lond.)*, 1933, n° 183. — Methods of biological assay depending on a quantal response.
92. I. A. GALLOWAY, W. J. ELFORD. — *Brit. J. exp. Path.*, 1931, 12, 407. — Filtration of the virus of foot-and-mouth disease through a new series of graded collodion.
93. S. GARD. — *Acta med scandinav.*, 1943, sup. 143. — Purification of poliomyelitis virus. Experiments on murine and human strains.
94. A. E. GESSLER, C. E. BENDER, M. C. PARKINSON. — *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1956, 18, 701. — A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteneization.
95. I. R. GIBBONS, J. R. G. BRADFIELD. — *Biochim. biophys. Acta*, 1956, 22, 506. — The fixation of cell nuclei by osmium tetroxide.
96. G. E. GIFFORD, H. E. ROBERTSON, J. T. SYVERTON. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1956, 93, 321 — Propagation *in vitro* of polioviruses. VIII. Effect of pH on virus yield and cell metabolism.
97. A. M. GLAUERT, G. E. ROGERS, R. H. GLAUERT. — *Nature (Lond.)*, 1956, 178, 803. — A new embedding medium for electron microscopy.
98. R. H. GOLDER. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1953, 75, 1739. — Concentration effect on sedimentation rate and its use in estimating molecular weights.
99. P. GRABAR. — *L'ultrafiltration fractionnée et son emploi dans l'étude des substances biologiques*. Dans : *Actualités scientifiques et industrielles*, 957. Hermann, Paris, 1943.
100. P. GUILLOT. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 93, 81. — Culture du virus de la fièvre aphteuse (type O) en cultures de tissus de reins de porc. I. Etude de l'infectivité.
101. J. B. S. HALDANE. — *J. Hyg. (Lond.)*, 1938, 39, 289. — Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method.

102. C. E. HALL. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1955, 1, 1. — Electron densitometry of stained virus particles.
103. C. E. HALL, M. A. JAKUS, F. O. SCHMITT. — *J. app. Phys.*, 1945, 16, 459. — The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains.
104. J. H. HANKS, R. E. WALLACE. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1949, 71, 196. — Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
105. C. G. HARFORD, A. HAMLIN, E. PARKER, T. RAVENSWAAY. — *J. exp. Med.*, 1956, 104, 443. — Electron microscopy of HeLa cells infected with adenoviruses.
106. B. D. HARRISON. — *Ann. appl. Biol.*, 1956, 44, 215. — Studies on the effect of temperature on virus multiplication in inoculated leaves.
107. F. HECKE. — *Zbl. Bakt.*, 1931, 119, 385. — Weitere Mitteilungen über die künstliche Vermehrung des Maul-und-Klauenseuche Virus in Gewebekulturen.
108. J. G. HELMCKE. — *Zbl. Bakt.*, 1953, 159, 308. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Strukturen verschiedener Membranfilter.
109. M. R. HILLEMANN, A. J. TOUSIMIS, J. H. WERNER. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1955, 89, 587. — Biophysical characterization of the RI (RI 67) viruses.
110. J. HILLIER, M. E. GETTNER. — *J. app. Phys.*, 1950, 21, 889. — Improved ultrathin sectioning of tissue for electron microscopy.
111. J. HILLIER, E. G. RAMBERG. — *J. app. Phys.*, 1947, 18, 48. — Magnetic electron microscope objective: contour phenomena and the attainment of high resolution power.
112. F. HIMMELWEIT, G. M. FINDLAY, E. M. HOWARD. — *Brit. J. exp. Path.*, 1950, 31, 809. — Size of Coxsackie virus as estimated by filtration through gradocol membranes.
113. D. I. HITCHCOCK. — *J. gen. Physiol.*, 1926, 9, 755. — The sizes of pores in collodion membranes.
114. D. I. HITCHCOCK. — *J. gen. Physiol.*, 1927, 10, 179. — The effect of pH on the permeability of collodion membranes coated with protein.
115. F. HOLWECK, S. E. LURIA, E. WOLLMAN. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1940, 210, 639. — Recherches sur le mode d'action des radiations sur les bactériophages.
116. A. E. HOOK, D. BEARD, A. R. TAYLOR, D. G. SHARP, J. W. BEARD. — *J. biol. Chem.*, 1946, 165, 241. — Isolation and characterization of the T2 bacteriophage of *E. Coli*.
117. L. HOYLE, R. REED, W. T. ASTBURY. — *Nature (Lond.)*, 1953, 171, 256. — Electron microscope studies of the structure of the influenza viruses.
118. J. JAGGER, E. C. POLLARD. — *Radiation Res.*, 1956, 4, 1. — Inactivation with fast charged particles of infectivity and hemagglutination in influenza virus.
119. L. W. JANSSEN. — Article analysé dans : *Rec. Méd. vét. Alfort.*, 1937, 113, 489. — Sur le virus de la fièvre aphteuse : préparation et purification par précipitation.
120. H. KAHLER, B. J. LLOYD. — *J. app. Phys.*, 1950, 21, 699. — Metallic evaporation and the diameter of tobacco mosaic virus with the electron microscope.
121. G. A. KAUSCHE, E. PFANKUCH, H. RUSKA. — *Naturwissenschaften*, 1939, 27, 292. — Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus in Übermikroskop.
122. E. KELLENBERGER, W. SCHWAB, A. RYTER. — *Experientia (Basel)*, 1956, 12, 421. — L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie.

123. S. F. KERN, R. A. KERN. — *J. app. Phys.*, 1950, 21, 705. — The apparent size of objects as observed in the electron microscope.
124. K. S. KHERA. — Thèse d'Université (Sciences), Paris, 1958. — *Etude du virus aphteux en couche monocellulaire de rein de porcelet.*
125. L. KILHAM, C. MORGAN, R. W. G. WYCKOFF. — *J. Immunol.*, 1951, 67, 523. — The electron microscopy of chick embryo membranes infected with Newcastle disease.
126. S. M. KLAINER, G. KEGELES. — *J. phys. Chem.*, 1955, 59, 952. — Simultaneous determination of molecular weights and sedimentation constants.
127. S. M. KLAINER, G. KEGELES. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, 63, 247. — The molecular weights of ribonuclease and bovine plasma albumin.
128. A. KLECZKOWSKI. — *J. gen. Microbiol.*, 1950, 4, 53. — Interpreting relationships between the concentrations of plant viruses and numbers of local lesions.
129. A. KLECZKOWSKI. — *J. gen. Microbiol.*, 1955, 13, 91. — The statistical analysis of plant virus assays; a transformation to include lesion numbers with small means.
130. V. L. KENIG, J. D. PERRINGS. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 36, 147 et 40, 218. — Critical ultracentrifugal and viscosity studies on bovine fibrinogen.
131. D. KARSSNOFF, L. REINIE. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1937, 124, 790. — Dimensions probables du virus de la fièvre aphteuse.
132. T. J. KUROTCHKIN, R. L. LIBBY, E. GAGNON, H. R. COX. — *J. Immunol.*, 1947, 55, 283. — Size and morphology of the elementary bodies of the psittacosis-lymphogranuloma group of virus.
133. L. W. LABAW, R. W. G. WYCKOFF. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, 67, 225. — The structure of southern bean mosaic virus protein crystals.
134. O. LAMM. — *Z. physik. Chem. A.*, 1928, 138, 313. — Zur Bestimmung von Konzentration gradienten mittels gekrümmter Lichtstrahlen.
135. M. A. LAUFFER. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1944, 66, 1188. — The size and shape of tobacco mosaic virus particles.
136. M. A. LAUFFER. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1944, 66, 1195. — The influence of concentration upon the sedimentation rate of tobacco mosaic virus.
137. M. A. LAUFFER, I. J. BENDET. — *Advanc. Virus Res.*, 1954, 2, 241. — The hydration of viruses.
138. M. A. LAUFFER, W. M. STANLEY. — *Chem. Rev.*, 1939, 24, 303. — The physical chemistry of tobacco mosaic virus protein.
139. M. A. LAUFFER, W. M. STANLEY. — *J. biol. Chem.*, 1940, 135, 463. — Studies on the sedimentation rate of bushy stunt virus.
140. M. A. LAUFFER, W. M. STANLEY. — *J. exp. Med.*, 1944, 80, 531. — Biophysical properties of preparation of PR8 influenza virus.
141. M. A. LAUFFER, N. W. TAYLOR, C. C. WUNDER. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 40, 453. — The influence of the composition of the medium upon the sedimentation rate of proteins: southern bean mosaic virus.
142. A. S. LAZARUS, K. F. MEYER. — *J. Bact.*, 1939, 38, 153. — The virus of psittacosis: centrifugation, filtration and measurement of particle size.
143. D. E. LEA. — *Nature (Lond.)*, 1940, 146, 137. — Determination of the sizes of viruses and genes by radiations methods.
144. D. E. LEA. — *Action of radiations on living cells.* — 1946. London. Cambridge University Press.

145. D. E. LEA, M. H. SALAMAN. — *Brit. J. exp. Path.*, 1942, 23, 27. — The inactivation of vaccinia virus by radiations.
146. D. E. LEA, M. H. SALAMAN. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1946, 133, 434. — Experiments on the inactivation of bacteriophage by radiations and their bearing on the nature of bacteriophage.
147. D. E. LEA, K. M. SMITH. — *Parasitology*, 1942, 34, 227. — The inactivation of plant viruses by radiations; the relation between inactivation dose and size of virus.
148. D. E. LEA, K. M. SMITH, B. HOLMES, R. MARKHAM. — *Parasitology*, 1944, 36, 110. — Direct and indirect actions of radiations on viruses and enzymes.
149. B. R. LEONARD, J. W. ANDEREGG, S. SHULMAN, P. KAESBERG, W. W. BEEMAN. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 12, 499. — An X ray investigation of the sizes and hydrations of three spherical viruses macromolecules in solution.
150. P. LEPINE. — *J. Chim. Phys.*, 1942, 39, 1. — Modèle d'ultracentrifugeuse sans système d'observation directe.
151. P. LEPINE, O. CROISSANT. — *Presse méd.*, 1952, 60, 1427. — Application de la microscopie électronique au diagnostic de la variole.
152. P. LEPINE, J. GIUNTINI. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, 69, 257. — Détermination sans observation directe du diamètre et de la constante de sédimentation du virus de la fièvre aphteuse.
153. P. LEPINE, J. GIUNTINI, J. C. LEVADITI. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, 67, 480. — Etude du virus de la lymphogranulomatose inguinale au moyen de l'ultracentrifugation.
154. P. LEPINE, J. C. LEVADITI, J. GIUNTINI. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, 68, 432. — Détermination par ultracentrifugations comparatives de la densité du virus vaccinal.
155. P. LEPINE, P. NICOLLE, J. GIUNTINI. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, 68, 503. — Sur la détermination de la taille des bactériophages par l'ultracentrifugation.
156. P. LEPINE, P. SLIZEWICZ, Ph. DANIEL, M. PACCAUD. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 654. — Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysât de caséine comme source d'acides aminés.
157. C. LEVADITI. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, 64, 359. — Ultravirus et fluorescence. Le virus vaccinal.
158. C. LEVADITI. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1942, 136, 96. — Taille du virus poliomyélitique, souche Lansing, mesurée d'après les données fournies par l'ultrafiltration.
159. C. LEVADITI. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1943, 137, 423. — Taille du virus aphteux, souches dermatrope et neurotrope.
160. C. LEVADITI, M. PAIC, D. KRASSNOFF. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1936, 121, 805. — Détermination des dimensions des ultravirus par l'ultrafiltration. Virus de l'herpès.
161. C. LEVADITI, M. PAIC, D. KRASSNOFF, J. VOOT. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1936, 122, 619. — Ultrafiltration et dimensions probables des virus de la fièvre aphteuse et de la stomatite vésiculaire.
162. C. LEVADITI, M. PAIC, J. VOOT, D. KRASSNOFF. — *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1936, 122, 354. — Ultrafiltrabilité et dimensions probables des bactériophages.
163. C. LEVINTHAL, H. W. FISHER. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1953, 18, 29. — Maturation of phage and the evidence or phage precursors.
164. H. LEYON. — *Exp. Cell Res.*, 1953, 4, 499. — The size of spontaneous mouse encephalomyelitis virus, strain FA, as determined by electron microscopy.

165. C. P. LI. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1957, 96, 354. — Studies on variation of virulence of poliomyelitis virus. II. Role of host cells and their maintenance medium.
166. C. P. LI, W. G. JAHNES. — *Virology*, 1956, 2, 828. — Studies on variation in virulence of poliomyelitis virus. I. The loss and gain of virulence of the mouse adapted type III of virus.
167. H. S. LORING, L. MARTON, C. E. SCHWERDT. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 1946, 62, 291. — Electron microscopy of purified Lansing virus.
168. F. N. LOW, J. A. FREEMAN. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, 2, 629. — Some experiments with chromium compounds as fixers for electron microscopy.
169. J. H. LUFT. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, 2, 799. — Permanganate. A new fixative for electron microscopy.
170. S. LURIA. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, 64, 415. — Méthodes statistiques appliquées à l'étude du mode d'action des ultravirus.
171. S. E. LURIA, F. M. EXNER. — *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1941, 27, 370. — The inactivation of bacteriophage by X rays: influence of the medium.
172. S. E. LURIA, R. C. WILLIAMS, R. C. BACKUS. — *J. Bact.*, 1951, 61, 179. — Electron micrographic counts of bacteriophage particles.
173. A. S. MACFARLANE, R. A. KECKWICK. — *Biochem. J.*, 1938, 32, 1607. — Physical properties of bushy stunt virus protein.
174. J. MACINTOSH, F. R. SELBIE. — *Brit. J. exp. Path.*, 1937, 18, 162. — The measurement of the size of viruses by high speed centrifugation.
175. A. D. MACLAREN. — *Acta chem. scandinav.*, 1950, 4, 386. — An apparent relationship between molecular weights and quantum yields for the inactivation of enzymes and viruses.
176. M. MAITLAND, H. MAITLAND. — *J. comp. Path.*, 1931, 44, 106. — Cultivation of foot-and-mouth disease virus.
177. R. MARKHAM. — *Progr. Biophys. biophys. Chem.*, 1953, 3, 61. — Some physicochemical studies on viruses.
178. R. MARKHAM, K. M. SMITH, D. LEA. — *Parasitology*, 1942, 34, 336. — The sizes of viruses and methods employed in their estimation.
179. R. MARKHAM, K. M. SMITH, R. W. G. WYCKOFF. — *Nature (Lond.)*, 1948, 161, 760. — Molecular arrangements in tobacco necrosis virus crystals.
180. C. F. T. MATTERN, H. G. DUBUY. — *Science*, 1956, 123, 1037. — Purification and crystallisation of Coxsackie virus.
181. V. MAZZARACCHIO, Z. ORFÈI, A. D'AMORE, L. RAVAIOLI, B. CASTAGNOLI. — *Zooprofilassi*, 1956, 11, 277. — Il virus aftoso su coltura di tessuti in vitro.
182. L. MELENDEZ, A. GAGGERO, R. RODRIGUEZ, M. NORAMBUENA. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1957, 95, 696. — Multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult kidney and embryonic lung, and heart bovine tissue cultures.
183. J. L. MELNICK, C. RAPPAPORT, D. D. BANKER, P. N. BHATT. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1955, 88, 676. — Stabilized suspensions of monkey kidney cells for intercontinental shipment.
184. J. L. MELNICK, M. RHIAN, J. WARREN, S. S. BREESE. — *J. Immunol.*, 1951, 67, 151. — The size of Coxsackie virus and Lansing poliomyelitis virus determined by sedimentation and ultrafiltration.
185. G. L. MILLER, R. H. GOLDER. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 36, 249. — Sedimentation studies with the Spinco ultracentrifuge.
186. G. L. MILLER, W. C. PRICE. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1946, 10, 467. — Physical and chemical studies on southern bean mosaic virus. Size, shape, hydration and elementary composition.

187. D. H. MOORE, P. M. GRIMLEY. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1957, 3, 255. — Problems in methacrylate embedding for electron microscopy.
188. C. MORGAN, S. A. ELLISON, H. M. ROSE, D. H. MOORE. — *J. exp. Med.*, 1954, 100, 301. — Structure and development of viruses observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowl-pox viruses.
189. C. MORGAN, S. A. ELLISON, H. M. ROSE, D. H. MOORE. — *Exp. Cell Res.*, 1955, 9, 572. — Serial sections of vaccinia virus examined at one stage of development in the electron microscope.
190. C. MORGAN, C. HOWE, H. M. ROSE, D. H. MOORE. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, 2, 351. — Structure and development of viruses observed in the electron microscope. IV. Viruses of the RI-APC group.
191. C. MORGAN, D. H. MOORE, H. M. ROSE. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1956, 2 suppl., 21. — Some effects of the microtome knife and electron beam on methacrylate embedded sections.
192. K. MUNK, W. W. ACKERMANN. — *J. Immunol.*, 1953, 71, 426. — Some properties of herpes simplex virus.
193. F. P. O. NAGLER, G. RAKE. — *J. Bact.*, 1948, 55, 45. — The use of the electron microscope in diagnosis of variola, vaccinia, and varicella.
194. G. E. PALADE. — *J. exp. Med.*, 1952, 95, 285. — A study of fixation for electron microscopy.
195. R. F. PARKER. — *J. exp. Med.*, 1938, 67, 725. — Statistical studies of the nature of the infectious unit of vaccine virus.
196. H. E. PEARSON, D. L. LAGERBORG, D. W. WISSER. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1956, 93, 61. — Chemical inhibitors of Theiler's virus.
197. H. G. PETERMAN, R. LANG, C. MACKOWIAK. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1956, 243 991. — Propagation du virus de la fièvre aphteuse en culture de tissus.
198. J. St. L. PHILPOT. — *Nature (Lond.)*, 1938, 141, 283. — Direct photography of ultracentrifuge sedimentation curves.
199. E. G. PICKELS, J. E. SMADEL. — *J. exp. Med.*, 1938, 68, 583. — Ultracentrifugation studies on the elementary bodies of vaccinia virus.
200. M. PIZZI. — *Human Biol.*, 1950, 22, 151. — Sampling variation in bioassay.
201. E. POLLARD. — *Advanc. Virus Res.*, 1954, 2, 109. — The action of radiation on viruses.
202. E. C. POLLARD, L. M. KRAFT. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1955, 88, 331. — Inactivation of MEF 1 poliomyelitis virus by ionizing radiations.
203. M. POLLARD, J. CONOLLY, S. FROMM. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1949, 71, 290. — The precipitating effect of methanol on viruses.
204. A. POLSON, G. SELZER. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, 15, 251. — Dispersion analysis of the MEF 1 strain of poliomyelitis virus.
205. W. C. PRICE, R. C. WILLIAMS, R. W. G. WYCKOFF. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1946, 9, 175. — Electron micrographs of crystalline plant viruses.
206. G. BAKE, H. P. JONES. — *J. exp. Med.*, 1942, 75, 323. — Studies on lymphogranuloma venereum.
207. A. RANDRUP. — *Acta path. microbiol. scandinav.*, 1952, 31, 385. — Ultracentrifugation of the virus of foot-and-mouth disease.
208. R. L. REAGAN, F. M. SANSONE, S. MOORE, A. L. BRUECKNER. — *Tex. Rep. Biol. Med.*, 1953, 11, 79. — Electron microscopic studies of herpes simplex virus after propagation in the swiss albino mouse.
209. L. J. REED, H. MUENCH. — *Amer. J. Hyg.*, 1938, 27, 493. — A simple method of estimating 50 per cent end points.
210. J. REGNIER, S. LAMBIN, E. SZOLLOSI. — *J. Physiol. Path. gén.*, 1937, 35, 329 et 709 et 950. — Pouvoir toxique des substances médicamenteuses.

211. A. G. RICHARDS, T. F. ANDERSON, R. T. HANCE. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1942, 51, 148. — A microtome sectioning technique for electron microscopy illustrated with sections of striated muscle.
212. A. B. SABIN, W. A. HENESSEN, J. WARREN. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1954, 85, 359. — Ultrafiltration and electron microscopy of three types of poliomyelitis virus propagated in tissue culture.
213. L. SALOMON. — Thèse Doctorat Sciences naturelles, Paris, 1952. — *Recherches biologiques sur la culture du virus de la fièvre aphteuse*.
214. K. K. SANFORD, W. R. EARLE, V. J. EVANS, H. K. WALTZ, J. E. SHANNON. — *J. nat. Cancer Inst.*, 1951, 11, 773 — The measurement of proliferation in tissue culture by enumeration of cell nuclei.
215. H. K. SCHACHMAN, M. A. LAUFFER. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1949, 71, 536. — The hydration, size and shape of tobacco mosaic virus.
216. H. K. SCHACHMAN, M. A. LAUFFER. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1950, 72, 4266. — The density correction of sedimentation constant.
217. F. L. SCHAFFER, C. E. SCHWERDT. — *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1955, 41, 1020. — Crystallisation of purified MEF 1 poliomyelitis virus particles.
218. M. SCHLESINGER. — *Biochem. Z.*, 1933, 264, 6. — Reindarstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen.
219. M. SCHLESINGER. — *Nature (Lond.)*, 1936, 138, 549. — Centrifuging in rotating hollow cylinders.
220. M. SCHLESINGER, C. H. ANDREWES. — *J. Hyg.*, 1937, 37, 521. — The filtration and centrifugation of the viruses of rabbit fibroma and rabbit papilloma.
221. M. SCHLESINGER, I. A. GALLOWAY. — *J. Hyg. (Lond.)*, 1937, 37, 441. — Sedimentation of the virus of foot-and-mouth disease in the Sharples super centrifuge.
222. P. SCHMIDT, P. KAESBERG, W. W. BEEMAN. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, 14, 1. — Small angle X ray scattering from turnip yellow mosaic virus.
223. C. E. SCHWERDT, J. FOGH. — *Virology*, 1957, 4, 41. — The ratio of physical particles per infectious unit observed for poliomyelitis virus.
224. C. E. SCHWERDT, R. C. WILLIAMS, W. M. STANLEY, F. L. SCHAFFER, M. E. MACCLAIN. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1954, 86, 310. — Morphology of type II poliomyelitis virus (MEF 1) as determined by electron microscopy.
225. R. F. SELLERS. — *Nature (Lond.)*, 1955, 176, 547. — Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures.
226. D. G. SHARP, J. W. BEARD. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1952, 81, 75. — Counts of virus particles by sedimentation on agar and electron micrography.
227. D. G. SHARP, E. A. ECKERT, D. BEARD, J. W. BEARD. — *J. Bact.*, 1952, 63, 151. — Morphology of the virus of avian erythromyeloblastic leucosis and a comparison with the agent of Newcastle disease.
228. D. G. SHARP, A. R. TAYLOR, D. BEARD, J. W. BEARD. — *Arch. Path. (Chicago)*, 1943, 36, 167. — Morphology of the Eastern and Western strains of the virus of equine encephalomyelitis.
229. D. G. SHARP, A. R. TAYLOR, A. E. HOOK, J. W. BEARD. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1946, 61, 259 — Rabbit papilloma and vaccinia viruses and T2 bacteriophage of E. Coli in shadow electron micrographs.
230. D. G. SHARP, A. R. TAYLOR, I. W. MACLEAN, D. BEARD, J. W. BEARD. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 159, 29. — Densities and sizes of the influenza viruses A (PR8 strain) and B (Lee strain) and the swine influenza virus.

231. S. SHULMAN. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 44, 230. — The determination of sedimentation constants with the oil-turbine and Spinco ultracentrifuge.
232. P. SLIZEWICZ. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 85, 503. — Sur la précision des mesures de constante de sédimentation.
233. J. E. SMADEL, E. G. PICKELS, T. SHEDLOVSKY. — *J. exp. Med.*, 1938, 68, 607. — Ultracentrifugation studies on the elementary bodies of vaccinia virus. II. The influence of sucrose, glycerol, and urea solutions on the physical nature of vaccinia virus.
234. K. M. SMITH. — *Virology*, 1956, 2, 706. — Apparent crystallisation of tomato bushy stunt virus in the cells of infected plants.
235. K. M. SMITH, W. D. MACCLEMENT. — *Parasitology*, 1941, 33, 320. — Further studies on the ultrafiltration of plant viruses.
236. K. SOLLNER, C. W. CARR. — *J. gen. Physiol.*, 1940, 24, 1 et 467; 1941, 25, 7 et 411; 1942, 26, 17 et 309. — The structure of the collodion membrane and its electrical behavior.
237. D. H. SPRUNT. — *J. exp. Med.*, 1942, 75, 297. — The effect of undernourishment on the susceptibility of the rabbit to infection with vaccinia.
238. T. SVEDBERG, K. O. PEDERSEN. — *The ultracentrifuge*. Oxford, Clarendon Press, 1940.
239. W. N. TAKAHASHI. — *Phytopathology*, 1951, 41, 142. — Ultraviolet absorption as a measure of tobacco mosaic virus nucleoprotein.
240. A. R. TAYLOR, D. G. SHARP, D. BEARD, J. W. BEARD, J. H. DINGLE, A. E. FELLER. — *J. Immunol.*, 1943, 47, 261 — Isolation and characterization of influenza A virus strain (PR8 strain).
241. J. F. TAYLOR. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 36, 357. — The determination of sedimentation constant with Spinco ultracentrifuge.
242. M. THEILER, S. GARD. — *J. exp. Med.*, 1940, 72, 49. — Encephalomyelitis of mice.
243. J. A. THOMAS. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1956, 242, 694. — Nouvelle méthode de production en grande quantité du virus de la fièvre aphteuse chez la vache, et propriétés du virus ainsi obtenu.
244. J. A. THOMAS, J. P. THIERY, L. SALOMON, L. SALOMON. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1952, 235, 520. — La culture du virus de la fièvre aphteuse en très grande quantité sur embryome spécifique géant chez la vache.
245. A. TISELIUS, K. O. PEDERSEN, I. B. ERIKSSON-QUENSEL. — *Nature (Lond.)*, 1937, 139, 546. — Observation of ultracentrifugal sedimentation by the Toepler Schlieren method.
246. A. J. TOUSIMIS, M. R. HILLEMANN. — *Virology*, 1957, 4, 499. — Electron microscopy of type 4 adenovirus, strain RI 67.
247. J. W. TREVAN. — *Proc. roy. Soc. B.*, 1927, 101, 483. — The error of determination of toxicity.
248. R. C. VALENTINE, A. ISAACS. — *J. gen. Microbiol.*, 1957, 16, 195. — The structure of influenza virus filaments and spheres.
249. J. D. WATSON. — *J. Bact.*, 1950, 60, 697. — The properties of X Ray inactivated bacteriophage. I. Inactivation by direct effects.
250. J. D. WATSON. — *J. Bact.* 1952, 63, 473. — The properties of X ray inactivated bacteriophage. II. Inactivation by indirect effects.
251. J. D. WATSON. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1954, 13, 10. — The structure of tobacco mosaic virus.
252. M. L. WATSON. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1957, 3, 1017. — Reduction of heating artifacts in thin sections examined in the electron microscope.
253. D. F. WAUGH, D. A. YPHANTIS. — *Rev. sci. Instr.*, 1952, 23, 609. — Rotor temperature measurement and control in the ultracentrifuge.

254. J. J. WEIGLE, G. BERTANI. — *Virology*, 1956, 2, 344. — Multiplicity reactivation of bacteriophage inactivated by ionizing radiations.
255. M. L. WEIL, D. BEARD, D. G. SHARP, J. W. BEARD. — *J. Immunol.*, 1948, 60, 561. — Purification, stability and culture of the mumps virus.
256. R. C. WILLIAMS. — *J. app. Phys.*, 1949, 20, 224. — Small spherical particles of exceptionally uniform size.
257. R. C. WILLIAMS. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 8, 227. — High resolution electron microscopy of the particles of tobacco mosaic virus.
258. R. C. WILLIAMS. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 9, 237. — Electron microscopy of Na desoxyribonucleate by use of a new freeze drying method.
259. R. C. WILLIAMS. — *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, 1953, 18, 185. — The shapes and sizes of purified viruses as determined by electron microscopy.
260. R. C. WILLIAMS. — *Advanc. Virus Res.*, 1954, 2, 183. — Electron microscopy of viruses.
261. R. C. WILLIAMS. — *Structure and substructure of viruses as seen under the electron microscope*. — *The nature of viruses* (Ciba Foundation Symposium), Churchill, London, 1957.
262. R. C. WILLIAMS, R. C. BACKUS. — *J. app. Phys.*, 1949, 20, 98. — The electron micrographic structure of shadow cast films and surface.
263. R. C. WILLIAMS, R. C. BACKUS. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1949, 71, 4052. — Macromolecular weights determined by direct particle counting: the weight of the bushy stunt virus particle.
264. R. C. WILLIAMS, R. C. BACKUS, R. L. STEERE. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1951, 73, 2062. — Macromolecular weights determined by direct particle counting. II. The weight of the tobacco mosaic virus particle.
265. R. C. WILLIAMS, D. FRASER. — *J. Bact.*, 1953, 66, 458. — Morphology of the seven T bacteriophages.
266. R. C. WILLIAMS, F. KALLMAN. — *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1955, 1, 301. — Interpretations of electron micrographs of single and serial sections.
267. R. C. WILLIAMS, R. L. STEERE. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1951, 73, 2057. — Electron microscopic studies on the unit of length of the particles of tobacco mosaic virus.
268. R. C. WILLIAMS, R. W. G. WYCKOFF. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1945, 58, 265. — Electron shadow micrography of virus particles.
269. C. WOESE, E. POLLARD. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 50, 354. — The effect of ionizing radiations on various properties of Newcastle disease virus.
270. E. WOLLMAN, A. LACASSAGNE. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, 64, 5. — Evaluation des dimensions des bactériophages au moyen des rayons X.
271. R. W. G. WYCKOFF. — *Progr. Biophys. biochem. Chem.*, 1951, 2, 224. — Electron microscopy of developing bacteriophages and other viruses.
272. J. S. YOUNGNER. — *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 1954, 85, 202. — Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin dispersed monkey kidney cells.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	7
1 ^{re} Partie : <i>Exposé critique des principales méthodes de mesure des virus</i>	11
A. — Titre d'une suspension virulente	11
1. Courbe de titrage. Transformation en probit.	11
2. Précision du titre. Ecart type	12
3. Utilisation des cultures cellulaires. Méthode des plaques	14
4. Autres méthodes de titrage	17
B. — Méthodes de filtration	18
C. — Méthodes de sédimentation	21
1. Détermination directe de la taille des virus	21
2. Ultracentrifugation. Constante de sédimentation	23
3. Volume spécifique	26
4. Dimensions et masse des particules	27
5. Dissymétrie et hydratation des particules	28
D. — Méthodes de la microscopie électronique	30
1. Métallisation des particules	30
2. Distorsions provoquées par le vide	31
3. Distorsions dans le microscope	32
4. Identification des particules de virus	32
5. Détermination de la masse des particules	34
6. Détermination de la taille des particules	34
7. Multiplication intracellulaire des virus	35
E. — Méthodes de mesure par les rayonnements et le bombardement corpusculaire	39
1. Action des rayonnements sur les virus	39
a) Radiations et corpuscules ionisants	40
b) Radiations non ionisantes	42
2. Action des virus sur les rayonnements	43
F. — Principaux résultats de mesure des virus	50

2 ^e Partie : <i>Etude des virus de la fièvre aphteuse</i>	53
A. — Méthode de culture du virus en cultures de cellules de reins de porc	54
1. Digestion et cultures de cellules de reins de porcelet	55
2. Milieux nutritifs pour les cultures cellulaires	57
3. Conservation des cellules	60
4. Effet cytotique des virus aphteux : passages et titrages	60
5. Précision du titre virulent	62
6. Méthode des plages	66
B. — Multiplication et conservation des virus de la fièvre aphteuse	69
1. Influence de l'âge des cultures cellulaires ..	70
2. Influence des conditions d'inoculation	70
3. Influence du milieu nutritif	
a) Sérum	71
b) Vitamines B	71
c) Glutamine	72
d) pH du milieu	72
4. Résistance cellulaire au virus	72
5. Conservation des virus	72
C. — Méthode de filtration	73
D. — Méthode de sédimentation	77
E. — Méthodes de la microscopie électronique	80
1. Etude du développement intracellulaire des virus	81
2. Corpuscules élémentaires de virus	86
3 ^e Partie : <i>Discussion générale</i>	89
Conclusions	93
Bibliographie	95

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

La méthode autoradiographique et ses applications.

Vu et approuvé :

Paris, le 19

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean SARRAILH

ACHEVE D'IMPRIMER
EN MARS 1959
SUR LES PRESSES DE J. PEYRONNET et Cie
IMPRIMEURS-EDITEURS
8, RUE DE FURSTENBERG, PARIS-6^e
Ateliers de Joigny (Yonne)

C. O. L. 31.0086

